

KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Projektträger Umweltchemikalien

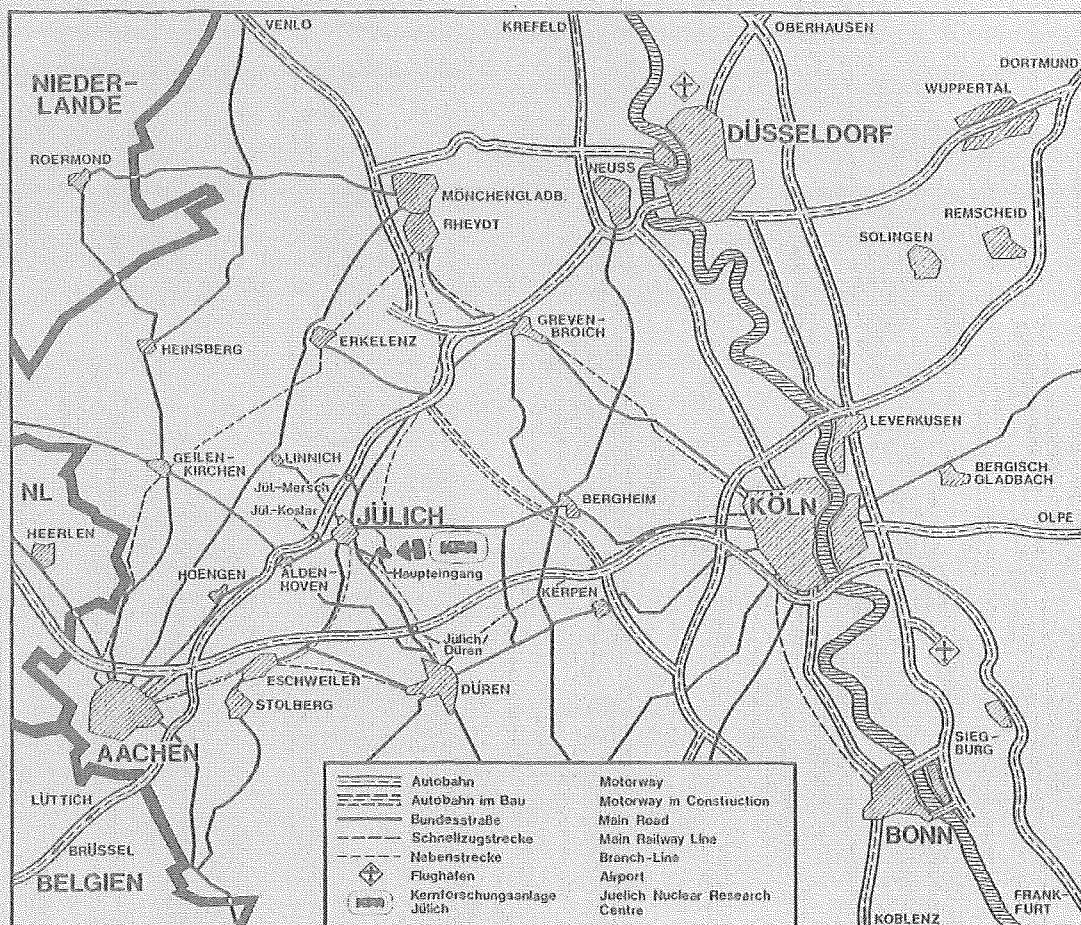
**METHODEN ZUR
OKOTOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNG
VON CHEMIKALIEN**

**Band 5:
Aquatische Systeme
Teil II
Bericht 1978 - 1984**

Herausgeber:

B. Scheele
F. Führ
E. Stüttgen

Jül - Spez - 276
Oktober 1984
ISSN 0343-7639



Als Manuskript gedruckt

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 276

Projektträger Umweltchemikalien Jülich - Spez - 276

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: (0 24 61) 610 · Telex: 8 33 556 kf d

**METHODEN ZUR
ÖKOTOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNG
VON CHEMIKALIEN**

**Band 5 :
Aquatische Systeme
Teil II
Bericht 1978 - 1984**

Herausgeber :

**B. Scheele
F. Führ
E. Stüttgen**

Kurzfassung

Im folgenden Bericht werden 9 Forschungsvorhaben vorgestellt, die im Rahmen des Förderungsprogrammes des Bundesministers für Forschung und Technologie (BMFT) "Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien" finanziert werden. Dieses Projekt wurde 1978 begonnen und hat die Aufgabe, begleitend und ergänzend zur Chemikaliengesetzgebung Methoden und Bewertungsstrategien zu erarbeiten, verbessern und zu standardisieren. In allen hier dargestellten Testmethoden werden sog. Referenzchemikalien eingesetzt, um die Testansätze ggf. miteinander vergleichen zu können bzw. ihre Aussagekraft anhand des weitgehend bekannten Umweltverhaltens dieser Chemikalien abschätzen zu können.

Acht der hier beschriebenen Testansätze befassen sich mit Möglichkeiten der Toxizitätsermittlung und versuchen Hinweise auf Bewertung solcher Befunde zu geben. Zwei davon benutzen kalorimetrische Systeme. Darüberhinaus wird eine Methode zur Ermittlung der anaeroben Abbaubarkeit von Chemikalien beschrieben und in ihrer Leistungsfähigkeit abgesichert (Teil 1 in Band I).

Summary

The following report presents the results of nine research projects being the second part of an extensive program under the title "Methods of ecotoxicological evaluation of chemicals". This program has been sponsored in connection with legislative activities related to the regulation of trading with chemicals since 1978 by the Dept. of Research and Technology. In all testing procedures under this program "Reference chemicals" had been used in order to more correctly evaluate the efficiency of comparable methods as well as to compare with the known behavior of the chemicals in the environment.

Seven of the testing methods presented on this volume deal with the evaluation of the toxic potential of a chemical. Two of these use calorimetric systems. Furthermore one testmethod refers to the anaerobic degradation of chemicals. The first part of this project is described in volume one.

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	1
2. Liste der Referenzchemikalien	4
3. Projektübersichten	5
3.1 Finanzübersicht	5
3.2 Thematische Übersicht	7
4. Forschungsberichte "Aquatische Systeme" II. Teil	9
4.1 Wagner, Jenkins; Stuttgart	9
4.2 Kirmaier, Reis; München	57
4.3 Schuller; Oldenburg	82
4.4 Backhaus, Reinhardt; Karlsruhe	115
4.5 Weber, Christlieb, Irmer; Hamburg	133
4.6 Melzer; München	163
4.7 Siebert; Frankfurt	206
4.8 Störkel Frankfurt	230
4.9 Hanke, Gluth, Giannaros, Zachmann, Müller; Karlsruhe	247

1. Einleitung

Der vorliegende Bericht enthält Ergebnisse des Forschungsprogramms "Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien". Dieses wurde 1977 gemeinsam von dem Bundesminister für Forschung und Technologie (BMFT) und dem Bundesminister des Innern (vertreten durch das Umweltbundesamt) ausgeschrieben und wird seit 1978 durch den BMFT finanziert. Das Forschungsprogramm wurde begleitend zu der Chemikaliengesetzgebung in der Bundesrepublik Deutschland und ähnlichen Aktivitäten der Europäischen Gemeinschaft konzipiert. Durch dieses sollen für die gesetzlich vorgeschriebene Bewertung der Umweltgefährlichkeit von "neuen Stoffen" Teststrategien und -methoden zur Feststellung der lokalen und allgemeinen Belastung sowie zur Abschätzung der Wirkungen von Chemikalien nach Einbringen in die Umwelt erarbeitet und beschriebene, verbessert, vereinfacht und standardisiert werden.

Das Umweltverhalten wird durch eine Vielzahl von Eigenschaften bestimmt. Die Arbeiten (s. auch Band I) befassen sich daher mit einem breiten Spektrum von unter dem Begriff "Ökotoxikologie" subsumierten Verhaltensmustern. Diese umfassen Toxizität, Abbaubarkeit/Persistenz und Akkumulation bis zur Verlagerung innerhalb und zwischen verschiedenen Umweltkompartimenten. Dementsprechend werden verschiedene Ausschnitte aus aquatischen und terrestrischen Lebensräumen sowie der Atmosphäre (Teilprojekt "Photoabbau") betrachtet.

Mit den vielfältigen experimentellen Ansätzen sollen folgende Aufgaben gelöst werden:

- Entwicklung, Verbesserung, Vereinfachung und Standardisierung von Prüfverfahren,
- den Aussagewert einer Methode exakt abzugrenzen, da jede Methode nur einen Ausschnitt aus einem Verhaltensmuster simuliert,
- verschiedene, voneinander unabhängige Untersuchungsverfahren (zur Ermittlung derselben Eigenschaft) zu vergleichen,
- die ökologische Relevanz von Teststrategien und -methoden zu ermitteln.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Einzelvorhaben zu erreichen, wurden 1978 von einem ad-hoc Ausschuß des BMFT beim Projektträger 26 Referenzchemikalien (s. Tab. Seite 4) ausgewählt (Referenzchemikalien als Hilfsmittel zur Auswertung eines Forschungsprogrammes - Ziele und Kriterien für die Auswahl (B. Scheele, Chemosphere 9, 293-309, 1980)). Zumindest thematisch aneinandergrenzende Vorhaben werden so durch Bearbeitung gleicher Chemikalien verbunden. Es wird erhofft,

- die im Hinblick auf die genannte Zielsetzung erforderliche Vergleichbarkeit der Vorhaben zu erreichen,
- einen Gesamtüberblick und vertiefte Informationen über das Verhalten einer Chemikalie zu gewinnen, indem die Ergebnisse nach dem Prinzip von Testbatterien aneinandergereiht werden können,
- Hinweise auf Zusammenhänge zwischen physikalisch-chemischen Stoffeigenschaften und dem Verhalten von Chemikalien in der Umwelt zu erhalten,
- einen Beitrag zur Lösung der Probleme, die bei der Prüfung "neuer Chemikalien" nach dem Chemikaliengesetz und dessen Ausführungsverordnungen entstehen, zu leisten.

Die allgemeine Charakterisierung dieser 26 Referenzchemikalien, ihre umweltrelevanten Daten (Produktionsmenge, Mobilität, Persistenz, Akkumulation und Schadwirkung), ihr Vorkommen in der Umwelt, Angaben zur Analytik sowie eine Literaturübersicht finden sich in den Merkblättern über Referenzchemikalien der Projektträgerschaft "Ökologische Forschung". Die Firma Riedel de Haen AG bietet unter dem Stichwort "OEKANAL-Referenzchemikalien" 21 dieser ausgewählten Standards mit einem Reinheitsgrad über 98 % an. Angaben über die Verunreinigungen sowie weitere Spezifikationen können über den Projektträger zur Verfügung gestellt werden.

Da das Forschungsprogramm langfristig angelegt ist und auch laufend neue Vorhaben in das Programm aufgenommen werden, enthält der vorliegende Band 5 nur abgeschlossene Arbeiten aus dem Themenbereich "Aquatische Systeme".

Die Thematik und der Stand der noch laufenden Vorhaben ist dem jährlich vom Projektträger zusammengestellten Projektbericht zu entnehmen. Dieser enthält Kurzberichte der Themenbereiche "Aquatische Systeme", "Terrestrische Ökosysteme", "Pflanzliche Zellkulturen und isolierte Pflanzenzellen", "Boden und Modellsysteme" und "Photochemischer Abbau".

In der Finanzierungsübersicht sind Förderungszeitraum und Bewilligungssumme der abgeschlossenen Vorhaben zusammengestellt.

Liste der als Referenzchemikalien ausgewählten
Substanzen

SYSTEMATISCHE BEZEICHNUNG	ABK. u. ANDERE CHEM. BEZEICHNUNG
Hexachlorbenzol	HCB, Perchlorbenzol
1.1.1-Trichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthan	DDT, Dichlor-diphenyl-trichlor- äthan
1.1-Dichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthan	DDD, Tetrachlordiphenyläthan
1.1-Dichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthylen	DDE, 1,1-bis-(4-chlorphenyl- äthan
Di-(2-äthylhexyl)-phthalat	DOP
Carbonyldiamid	Harnstoff
Perylen	
Fluoranthren	
Benzol	
Toluol	
Phenol	
2-Nitrophenol; 4-Nitrophenol	
Pentachlorphenol	PCP
Anilin	
p-Chloranilin	
Na-Dodekylbenzolsulfonat	LAS, Marlon A ^R ca. 12 Typen
Dichlorphenoxyessigsäure	2,4-D
Trichlorphenoxyessigsäure	2,4,5-T
2-Äthylamino-4-chlor-6- (2-propyl-amino)-1.3.5-triazin	Atrazin
HgCl ₂	
Methanol	
Äthylacetat	
Trichloräthylen	
Äthylen	
1,2,4-Trichlorbenzol	

3.1 Finanzübersicht

KENN- ZEICHEN	DURCHFÜHRENDE STELLE VORHABENLEITER	THEMA	FÖRDERSUMME IN TDM JAHR GESAMT	LAUFZEIT
03 7286	Universität Stuttgart R. WAGNER	Bewertung einer Methode zur Prüfung des Abbauverhaltens von organischen Substanzen unter anaeroben Bedingungen	1981: 75,2 291,8 1982: 143,6 1983: 73,0	01.07.81 - 31.08.83
03 7267	Inst. f. Biomed. Techn. München N. KIRMAIER	Biokalorimeter zur Messung indikatorischer Werte (Sauer- stoffverbrauch und Wärme- produktion) für den Be- lastungsgrad von Wässern	1979: 199,15 679,3 1980: 113,15 1981: 191,0 1982: 176,0	01.01.79 - 31.12.82
03 7291	Universität Oldenburg D. SCHULLER	Mikrokalorimetrisches Ver- fahren zur ökotoxikolo- gischen Beurteilung von Umweltchemikalien	1979: 50,0 425,45 1980: 115,0 1981: 84,7 1982: 74,0 1983: 66,75 1984: 35,0	01.01.79 - 30.06.84
03 7268	LA f. Umweltschutz Karlsruhe D. BACKHAUS	Standardisierter Mikroauf- wuchs als Testobjekt für ökochemische Faktoren im Wasser	1978: 23,7 442,4 1979: 120,1 1980: 70,6 1981: 109,6 1982: 117,4 1983: 1,0	01.10.78 - 30.06.83
03 7293	Universität Hamburg A. WEBER	Chemikali toxizitätstests und Multi-Spezies-Testsystem für aquatische Ökosysteme	1982: 125,75 229,5 1983: 103,75	01.01.82 - 31.03.84

KENN- ZEICHEN	DURCHFÜHRENDE STELLE VORHABENLEITER	THEMA	FÖRDERSUMME IN TDM JAHR GESAMT		LAUFZEIT
03 7248	T.U. München A. MELZER	Wasserpflanzen und aqua- tische Nahrungsketten als Testobjekte für die Er- mittlung der ökotoxikolo- gischen Wirkung von Chemikalien	1980: 440,2	808,0	01.03.80 - 28.02.83
			1981: 198,8		
			1982: 141,3		
			1983: 27,7		
03 7228	Universität Frankfurt G. SIEBERT	Populationsdynamik von Rotato- rien als Indikator für sub- lethale Schadstoffwirkungen	1979: 234,0	839,0	01.01.79 - 31.03.84
			1980: 153,9		
			1981: 154,8		
			1982: 170,6		
			1983: 110,7		
			1984: 15,0		
03 7233	Universität Frankfurt C. WISSEL	Testapparatur für Effekte von Chemikalien auf Plankton- Lebensgemeinschaften	1979: 46,0	327,8	01.01.79 - 31.12.83
			1980: 79,7		
			1981: 62,5		
			1982: 73,6		
			1983: 66,0		
03 7274	Universität Karlsruhe W. HANKE	Mechanismen der Schadstoff- wirkungen bei Fischen	1979: 64,85	728,0	01.04.79 - 30.04.84
			1980: 168,0		
			1981: 159,15		
			1982: 148,0		
			1983: 148,0		
			1984: 40,0		

3.2 Thematische Übersicht

Kenn- zeichen	Problemstellung	(Referenz-) Chemikalien	Seite
03 7286	Verbesserung einer Meßmethode der anaeroben Abbaubarkeit organischer Substanzen über die CO-2 und OH-4-Produktion (apparative Anordnung, experimentelle Vorgehensweise, computerunterstützte Auswertung) Anwendung auf Prüfchemikalien und Reihung von diesen nach Abbaubarkeit	Acetonitril, Äthanol, Maltose, PCP, Dedecylsulfat, u.a. Verbindungen	9
03 7267	Bioenergetischer Toxizitätstest mit simultaner Messung der O-2- und Wärmeproduktion in einem quasi drabatischen Kalorimetersystem unter Verwendung von Hefe- und Bakterienzellen	Phenol, PCP, HCB, 2,4-D, Nitrophenole, HgCl ₂ , Toluol u.a.	57
03 7291	Mikrokalorimetrische Untersuchungen an kontinuierlich gehaltenen Reinkulturen und Arbeiten zur Standardisierung und Charakterisierung von kontinuierlich gehaltenen Mischkulturen. Messung des Energieumsatzes nach dem Wärme fluß-Differenzprinzip in quasi isothermer Betriebsart	Phenol, Nitrophenole, PCP, HgCl ₂	82
03 7268	Eignungsprüfung eines unter teilstandardisierten Bedingungen arbeitenden zylindrischen Aufwuchssammlers als nächsthöhere Stufe der Testausführung zwischen Einzelspezietests und ganzen Ökosystemausschnitten	Hg, Trichloräthylen, Anilin, PCP, Dodecylsulfat, 2,4-D, Methanol	115
03 7293	Vergleichende Prüfung verschiedener Chemikalien in 2 unterschiedlichen Komplexen/Algentests: 1) Screening-System, Parameter, Wiederergründung von Dauerstadien 2) 7 Spezies enthaltendes System, Parameter, Sukzession	Nitrophenole, PCP, Benzol, Phenol, Methanol, Harnstoff u.a.	133

Kenn- zeichen	Problemstellung	(Referenz-) Chemikalien	Seite
03 7248	Untersuchungen der Akkumulation von PCP in Wasserpflanzen aus Hart- und Weichwasserbiotopen in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern, sowie in phytophagen Tieren. Erfassung der Wirkung auf N-Metabolismus	PCP, Äthylen, Nitrophenole, 2,4-D HgCl ₂ , Atrazin	163
03 7228	Entwicklung eines Standardtests, bei dem die Wirkung von Chemikalien auf die Populationsparameter des Rädertiers <i>Brachionus rubens</i> Ehrenberg ermittelt wird	Nitrophenole, Chloranilin, PCP, 2,4-D	206
03 7233	Zweistufige Labornahrungskette für ökotoxikologische Langzeit-Untersuchungen (21d) mit Alge <i>Scenedesmus acutus</i> und <i>Daphnia magna</i> , in der das Populationswachstum der Daphnien und die Absorptionsänderungen der Algenkulturen gemessen werden.	PCP, 4-Nitrophenol, Chloranilin, 2,4-D Atrazin	230
03 7274	Wirkung sublethaler Schadstoffkonzentrationen auf biochemisch-physiologische Parameter und Anschwimmverhalten gegen Strömung. Diskussion der Anwendbarkeit	PCP, Phenol, Methanol, Harnstoff, Atrazin	247

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7286)

Untersuchungen zur differenzierenden Bewertung einer
Methode zur Prüfung des Abbauverhaltens von
organischen Substanzen unter anaeroben Bedingungen

von

Prof. Dr.-Ing. R. Wagner

und

Dipl.-Chem. Dr. E.-B. Jenkins

Institut für Siedlungswasserbau,
Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität
Stuttgart

Institutsleiter:

Prof. Dr.-Ing. K.-H. Hunken

November 1983

Kurzfassung

=====

Untersuchungen zur differenzierenden Bewertung einer Methode zur Prüfung des Abbauverhaltens von organischen Substanzen unter anaeroben Bedingungen

Eine Methode zur Prüfung des Abbauverhaltens organischer Substanzen unter anaeroben Bedingungen, bei der die von der (jeweils in abgestuften Konzentrationen in Faulmatrices eingebrachten) Testsubstanz produzierten Methan- und Kohlendioxidmengen innerhalb einer bestimmten Zeit erfaßt werden, wurde apparativ und hinsichtlich der experimentellen Durchführung sowie der Meßdaten-Auswertetechnik verbessert. Im Zuge der weiteren Erprobung und Absicherung der Methode wurde das Abbauverhalten einer Reihe von Reinsubstanzen, u. a. einige Chemikalien der Referenzliste, untersucht und die Ergebnisse daraufhin nach den folgenden Gesichtspunkten beurteilt: "anaerob abbaubar", "anaerob inert", "anaerob hemmend", "anaerob toxisch". Darüberhinaus wurden bei Untersuchungen mit zwei Modellsubstanzen die auf indirektem Wege mit der Routinemethode erarbeiteten Ergebnisse durch versuchsbegleitende, substanzspezifische Analysen abgesichert.

Summary

=====

Critical Evaluation of a Method for Assaying the Biodegradability of Organic Substances in Anaerobic Media

The biodegradability of an organic substance in an anaerobic matrix can be assayed by measuring the amounts of methane and carbon dioxide produced by different concentrations of the substance during a specific time period. The method for carrying out anaerobic biodegradability tests based on this principle was improved upon in respect to the apparatus used, experimental procedures and the mathematical evaluation of the experimental data. In the course of further proof-testing and verification of the method the anaerobic biodegradability of a number of pure substances, among others several chemicals from the "Reference List" (published by the Battelle Institut, Frankfurt/Main on commission of the Project Administration for Environmental Chemicals of the Federal Ministry for Research and Technology), was investigated and the substances characterized according to the following aspects: "biodegradable", "inert", "hindering" or "toxic" under anaerobic conditions. Furthermore the results ascertained indirectly by the routine method were verified exemplarily using two model substances, for which direct, specific analyses were carried out on a parallel basis during the biodegradability test according to the above-mentioned method.

Abschlußbericht

=====

Untersuchungen zur differenzierenden Bewertung
einer Methode zur Prüfung des Abbauverhaltens von
organischen Substanzen unter anaeroben Bedingungen

Förderkennzeichen: 03 7286

Inhaltsverzeichnis

=====

- 1.0 Einleitung und Zielsetzung
- 2.0 Methodik
 - 2.1 Experimentelle Durchführung
 - 2.2 Auswertetechnik
- 3.0 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Routineuntersuchungen
- 4.0 Ergebnisse der Untersuchungen mit versuchsbegleitender, substanzspezifischer Analytik
 - Methanol als Testsubstanz
 - Ethylacetat (Essigsäureethylester)
als Testsubstanz
- 5.0 Literatur

Anhang: Substanzdatenblätter

1.0 Einleitung und Zielsetzung

Zur vollständigen Beurteilung der Umweltverträglichkeit anthropogener Substanzen (bzw. sogenannter "Umweltchemikalien") gehört außer den Informationen über deren Abbauverhalten unter aeroben Bedingungen auch die Kenntnis des Verhaltens dieser Substanzen unter anaeroben Bedingungen. Im konkreten Sinne bezieht sich diese Forderung einerseits auf die Existenz von ökotoxikologisch wichtigen, anaeroben Kompartimenten. Beispiele hierfür sind Mülldeponien, Sumpf- und Mooregebiete, Fluß- und Seensedimente, reduzierte Grundwässer usw. Zum anderen gibt es zahlreiche feste und flüssige Abfallstoffe, deren umweltkompatible Beseitigung noch erhebliche Schwierigkeiten bereitet. Diesem technologischen Bereich zuzuordnen sind Schlämme und Abwasserkonzentrate, die in den Faulräumen von Kläranlagen behandelt werden. Für die vielleicht sogar nutzbringende Beseitigung mancher dieser Stoffe stehen unter anderem auch anaerobe oder anaerob-aerob kombinierte Behandlungsverfahren zur Diskussion. Zur Beurteilung der Zweckmäßigkeit solcher Vorgehensweisen werden jedoch fundierte Daten, aus denen sich die Erfolgsaussichten der vorgesehenen anaeroben Behandlung prognostizieren lassen, benötigt.

Vor diesen und ähnlichen Hintergründen war es somit das Ziel der Arbeiten in diesem Forschungsvorhaben, eine in ihren Grundzügen bereits entwickelte und orientierend erprobte Methode zur Prüfung des anaeroben Abbauverhaltens organischer Substanzen (1) unter den folgenden Aspekten abzusichern:

- a) Verbesserung der apparativen Anordnung, der experimentellen Vorgehensweise und der computerunterstützten Auswertung, besonders im Hinblick auf die routinemäßige Anwendung der Methode.
- b) Weitere Erprobung des Prüfverfahrens an einer Reihe von Testsubstanzen, unter anderem Chemikalien der Referenzliste (2).

- c) Prüfung der Aussagen der nach dem Grundkonzept der Methode indirekt gewonnenen Ergebnisse durch eine geeignete, versuchsbegleitende, substanzspezifische Analytik an ausgewählten Modellsubstanzen.

2.0 Methodik

Der Testmethode zugrunde liegt die Tatsache, daß bei der anaeroben, mikrobiellen Zersetzung organischer Substanzen neben Biomasse und huminstoffartigen Verbindungen Methan und Kohlendioxid als Hauptreaktionsprodukte entstehen.

2.1 Experimentelle Durchführung

Nach Herstellung einer Stammlösung der Testsubstanz wird eine 10 Verdünnungsstufen umfassende Mischungsreihe nach dem Ergänzungsverfahren mit verschiedenen Anteilen der Testsubstanzlösung in einer vorkultivierten Faulmatrix auf der Basis von ausgefaultem kommunalem Klärschlamm mit Zusätzen von Fischmehl und Weizenkleie angesetzt.

Die auf diese Weise hergestellten Reaktionsmischungen werden nach gründlicher Durchspülung der Reaktionsapparaturen mit reinem Stickstoff in der Regel 21 bis 28 Tage lang bei 30 °C (in einem Thermokonstantraum) unter ständiger Umwälzung sich selbst zur Faulung überlassen. In verschiedenen Zeitabständen - je nach Intensität der Faulgasproduktion, z. B. nach 1, 2, 3, 5, 9, 14, 21 und 28 Tagen - wird die entstandene Faulgasmenge ermittelt und das Faulgas nach vollständiger Homogenisierung abgenommen. Für den Versuchslauf beginnt damit ein neuer Meßabschnitt. Das abgenommene, stickstoffhaltige Faulgas wird anschliessend gaschromatographisch auf seinen Methan- und Kohlendioxidgehalt untersucht.

Abbildung 1 zeigt eine der Reaktionsapparaturen, von denen jeweils 10 zu einer Batterie zur Aufnahme der Mischungsreihe für einen Versuchslauf zusammengestellt wurden.

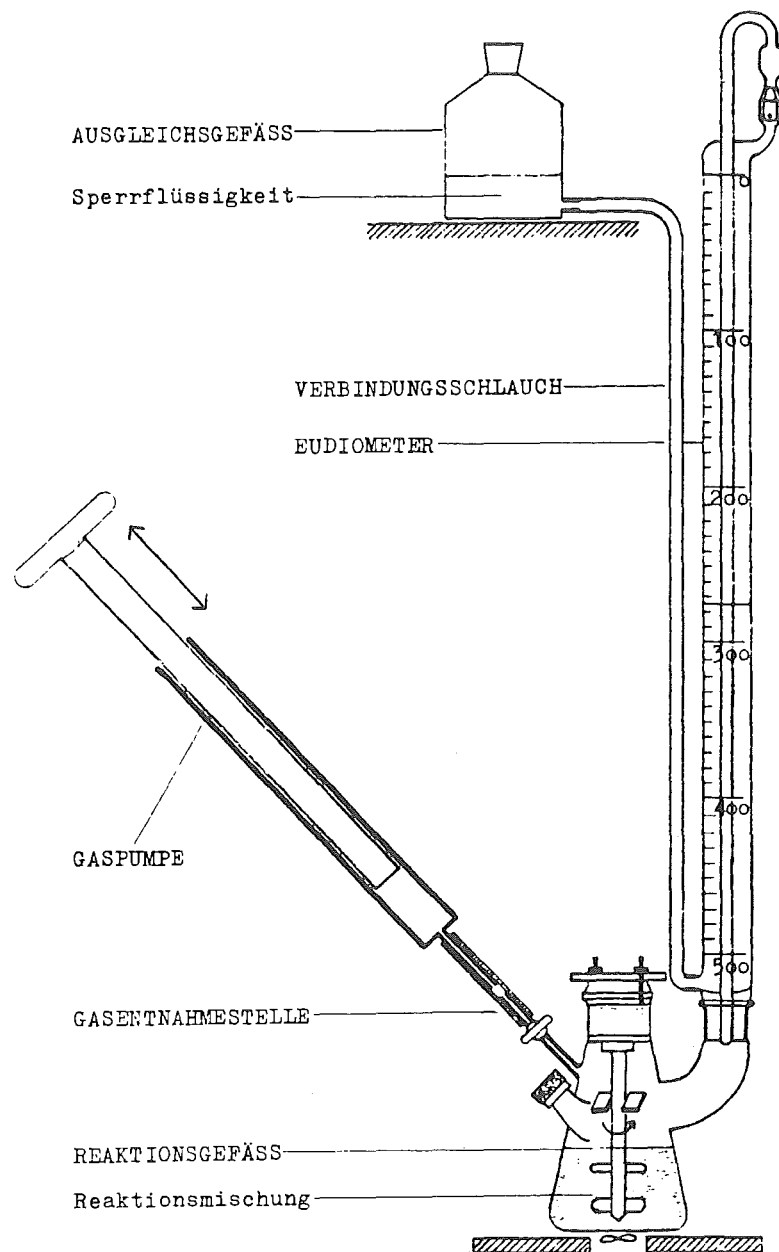


Abbildung 1 Versuchsanordnung für eine Reaktionsmischung bei der Untersuchung des anaeroben Abbauverhaltens organischer Substanzen

2.2 Auswertetechnik

Die Ergebnisse aus entsprechenden Rechengängen mit den Rohdaten (Faulgasmenge, Methan- und Kohlendioxidanteile des Faulgases) aller Meßabschnitte erlauben Aussagen sowohl über das zeit- und konzentrationsabhängige Abbauverhalten der betreffenden Testsubstanz als auch über den unter den Versuchsbedingungen erreichten Abbaugrad.

2.2.1 Berechnung der produzierten Gasmengen

Die Berechnung der in einem Versuchslauf von einer Reaktionsmischung produzierten Gasmengen ΔM (in mmol/l) erfolgt nach Gleichung 1.

$$\Delta M = [(p_1 - p_w)(V_t + V_1) \cdot x_1 - (p_0 - p_w)(V_t + V_0) \cdot x_0] \cdot F \quad (\text{mmol/l}) \quad (1)$$

Hierin bedeuten:

p_w : Wasserdampfpartialdruck bei 30 °C ($p_w = 31,824$ Torr)

V_t : Totvolumen der Apparatur (= Volumen des Gasraumes über der Reaktionsmischung bis zur Nullmarke des Eudiometers)

p_0 : Barometerstand (Torr)

V_0 : Eudiometerablesung (ml)

x_0 : Volumenanteil des Gases

} zu Beginn eines
Meßabschnittes

p_1 : Barometerstand (Torr)

V_1 : Eudiometerablesung (ml)

x_1 : Volumenanteil des Gases

} am Ende eines
Meßabschnittes

$$F = 1/(R \cdot T \cdot V_p) = 1,3224 \cdot 10^{-4} \quad (\text{Mol}/(\text{Torr} \cdot \text{l}^2))$$

R : Allgemeine Gaskonstante

T : Versuchsraumtemperatur in K

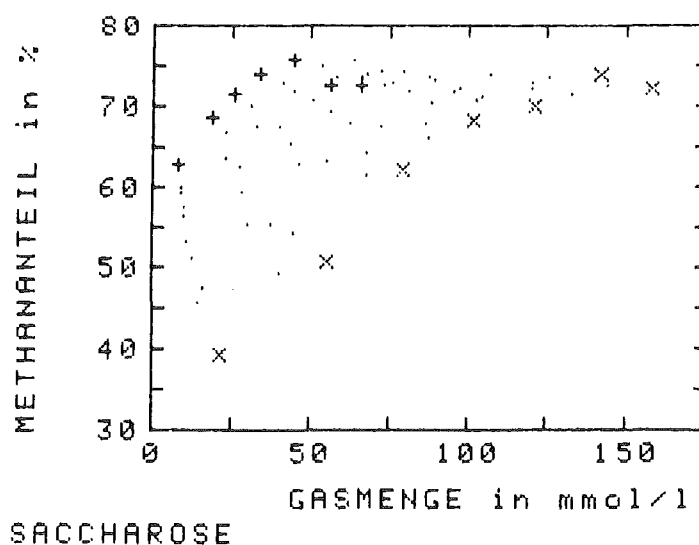
V_p : Volumen des Reaktionsgemisches ($V_p = 0,4$ l)

Faulgasmengen werden berechnet, indem jeweils $x_0 = x_1 = 1$ gesetzt wird. Die Gesamtmenge eines von einer Reaktionsmischung im Lauf eines Versuches produzierten Gases ergibt sich aus der Summe der für die einzelnen Meßabschnitte ermittelten Teilmengen.

2.2.2 Graphische Darstellung des Methangehaltes im Faulgas

Bei dieser Art der Auswertung und Darstellung der Meßergebnisse wird jeweils der Methangehalt über der insgesamt entwickelten Faulgasmenge, bezogen auf den Anteil der Faulmatrix in der betreffenden Reaktionsmischung, aufgetragen. Diese Darstellungsweise erfaßt alle Meßpunkte eines Versuchslaufes (alle Konzentrationsreihen über die Zeit) in einem Diagramm. Abbildung 2 zeigt ein entsprechendes Diagramm für die Testsubstanz Saccharose.

Abbildung 2 Methananteil
im Faulgas



Mit "+" sind die Zeitreihenwerte der Reaktionsmischung mit der Konzentration 0 ml/l (= Faulmatrix) und mit "x" diejenigen der Reaktionsmischung mit dem maximalen Zusatz der Testsubstanzlösung (bis zu 225 ml/l) gekennzeichnet. Alle dazwischen liegenden Werte sind durch Punkte dargestellt, sodaß in günstigen Fällen die Konzentrationsreihen (+.....x Δ 0 bis 225 ml/l)

recht gut zu erkennen sind. Beim anaeroben Abbau einer Testsubstanz reicht jeweils die Reihe der x-Werte weiter nach rechts im Diagramm als diejenigen der +-Werte. Aus dem vorliegenden Diagramm für Saccharose geht hervor, daß diese Substanz in geradezu typischer Weise unter anaeroben Bedingungen gut abgebaut wird.

2.2.3 Auswertung der Versuchsdaten im Hinblick auf das Konzentrationsabhängige Abbauverhalten der Testsubstanz

Die Konzentrationsabhängigkeit des Abbauverhaltens unter anaeroben Bedingungen läßt sich bei einer nach dem Ergänzungsverfahren hergestellten Mischungsreihe für eine vorgegebene Versuchszeit gemäß der folgendermaßen formulierten Mischungsregel errechnen und graphisch darstellen (1,3,4,5,6):

$$G_M = \frac{v}{1000} \cdot G_S + \frac{1000-v}{1000} \cdot G_F \quad (2)$$

Hierin bedeuten:

- v: Volumenanteile der Testlösung in den Reaktionsmischungen (in Promillen)
- G_M : von der jeweiligen Reaktionsmischung mit dem Volumenanteil v (in Promillen) der Testlösung insgesamt produzierte Menge eines Gases, (z. B. in mmol/l)
- G_S : die je Volumeneinheit der Testsubstanzlösung gelieferte Menge eines Gases, (z. B. in mmol/l)
- G_F : die je Volumeneinheit der Faulmatrix gelieferte Menge eines Gases, (z. B. in mmol/l).

Durch Umformung ergibt sich:

$$\frac{1000}{1000-v} \cdot G_M = \frac{v}{1000-v} \cdot G_S + G_F \quad (3)$$

Die Beziehung (3) entspricht der allgemeinen Form einer Geradengleichung, $Y = A \cdot X + B$, wenn

$$Y = \frac{1000}{1000-v} \cdot G_M$$

$$X = \frac{v}{1000-v}$$

$$A = G_S$$

$$B = G_F$$

gesetzt werden.

Durch Auftragung der Punktfolge für eine Mischungsreihe kann man also prüfen, inwieweit deren Verhalten der Mischungsregel gehorcht und dabei eventuelle Abweichungen von der Additivität an Hand des Kurvenbildes erkennen.

Abbildung 3 zeigt einige Beispiele für Kurvenzüge, wie sie sich bei verschiedenen Arten der Konzentrationsabhängigkeit des Abbauverhaltens ergeben.

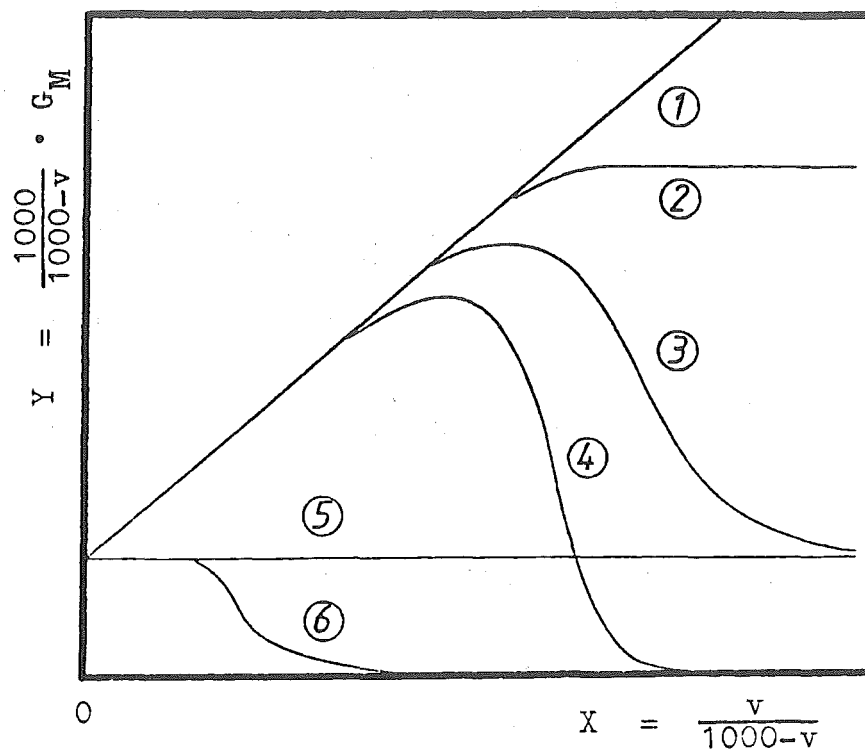


Abbildung 3 Kurventypen, wie sie bei der graphischen Additivitätskontrolle der Faulgas-, Methan- oder Kohlendioxidproduktion beobachtet werden. (Konzentrationsabhängigkeit des Abbauverhaltens der Testsubstanz)

Die einzelnen Kurventypen lassen dann folgende Beurteilungen des anaeroben Abbauverhaltens der jeweils zugehörigen Testsubstanzen zu:

Kurve 1: "abbaubar" im gesamten, untersuchten Konzentrationsbereich.

- Kurve 2: "abbaubar" bis zu einer bestimmten Konzentration; darüberhinausgehende Anteile verhalten sich inert.
- " 3: "abbaubar" nur im unteren Teil des untersuchten Konzentrationsbereiches; bei höheren Konzentrationen schließlich nicht abbaubar, jedoch "inert" der Faulmatrix gegenüber.
- " 4: "abbaubar" nur im unteren Teil des untersuchten Konzentrationsbereiches; mit zunehmender Konzentration "hemmend" und schließlich "toxisch".
- " 5: "inert" im gesamten untersuchten Konzentrationsbereiches.
- " 6: "nicht abbaubar"; im unteren Konzentrationsbereich "inert"; bei höheren Konzentrationen "toxisch".

Im Verlauf eines Abbauversuches können in einer Konzentrationsreihe auch mehrere dieser Kurventypen nacheinander auftreten. Häufig ergeben sich bei den anfänglichen Versuchszeiten Kurven vom Typ (5), die mit fortschreitender Versuchsdauer in solche vom Typ (3), (2) oder gar (1) übergehen. Dies bedeutet dann, daß eine Anpassungsphase der Mikrobiozönose an das jeweilige Testsubstrat dessen eigentlichem Abbau, der ggf. den vollen, untersuchten Konzentrationsbereich umfaßt, vorangeht.

Im Grunde genommen müßte man erwarten können, daß die Kurven zur Beschreibung der Faulgas-, Methan- und Kohlendioxidproduktionen einer Konzentrationsreihe denselben Verlauf aufweisen. Auf Grund der nicht immer im gleichen Maße gegebenen Bindung des Kohlendioxids in den Reaktionsmischungen und wegen seiner nicht völligen Unlöslichkeit in der Eudiometer-Sperrflüssigkeit ist eine solche Übereinstimmung experimentell jedoch nur bedingt realisierbar. Dies umso weniger, wenn zum Beispiel am Versuchsanfang (u. U. auch im weiteren Versuchsverlauf) Hydrolyseprodukte oder andere Metabolite des Testsubstrates stark voneinander abweichende pH-Werte in den einzelnen Reaktionsansätzen einer Konzentrationsreihe zur Folge haben. Außerdem verändert sich die Sättigungsgrenze der Kohlendioxid-Aufnahme in den Reaktionsmischungen (und damit die Kohlendioxidanteile, die in die Gasräume der Reaktionsgefäße ge-

langen) in dem Maße, in dem während der Abbauprozesse Ammonium-Stickstoff aus organischer Bindung freigesetzt wird, der zur chemischen Bindung des Kohlendioxids beiträgt:



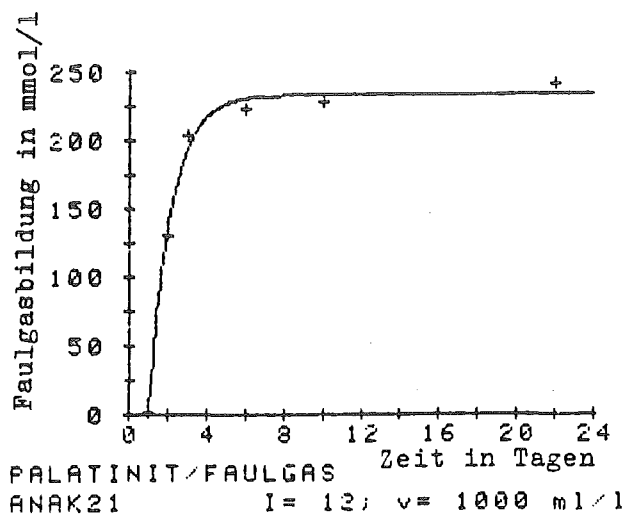
Wegen dieser Unsicherheiten sind zuverlässigere Aussagen über das anaerobe Abbauverhalten einer Testsubstanz in der Regel aus den Daten über die Methanproduktion zu erhalten.

2.2.4 Auswertung der Versuchsdaten im Hinblick auf das zeitabhängige Abbauverhalten der Testsubstanz

Die Auswertung der Versuchsdaten mit dem Ziel, das zeitabhängige Abbauverhalten einer Testsubstanz und somit die beim vollständigen Umsatz der Testsubstanz-Stammlösung zu erwartenden Gasmengen zu ermitteln, ist auf relativ zuverlässige Art und Weise durchführbar, wenn die betreffende Testsubstanz am Ende des Versuchslaufes als "abbaubar" im gesamten, untersuchten Konzentrationsbereich zu beurteilen ist (Kurventyp 1 im vorangegangenen Abschnitt). Hierbei werden die aus den linearen Abschnitten der Kurven zur Additivitäts-Kontrolle errechneten Gasmengen gegen die Zeit aufgetragen. Die daraus resultierenden Punktefolgen lassen sich in der Regel in guter Näherung durch eine exponentielle (formal 1. Reaktionsordnung) oder hyperbolische (formal höhere Reaktionsordnung) Funktion beschreiben. Abbildung 4 veranschaulicht die Ergebnisse derartiger Auswertungen mit einer hyperbolischen Funktion für die Testsubstanz Palatinit (hydrierte Isomaltulose).

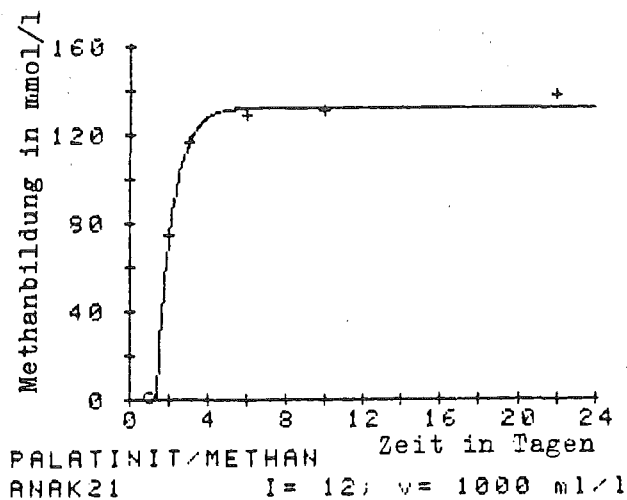
PALATINIT/FAULGAS
 ANAK21 I= 12; v= 1000 ml/l

 L= 233.58454 k= 0.88940474
 Yo=-334.44422 δ= 0.99912665
 N= 6 r= 0.99693195
 n= 1.00 P= INF



PALATINIT/METHAN
 ANAK21 I= 12; v= 1000 ml/l

 L= 132.44172 k= 1.28257838
 Yo=-627.20514 δ= 1.36187465
 N= 5 r= 0.99219036
 n= 1.00 P= INF



PALATINIT/CO₂
 ANAK21 I= 12; v= 1000 ml/l

 L= 88.21006 k= 1.75594030
 Yo=-831.58696 δ= 1.33514335
 N= 5 r= 0.97894940
 n= 1.00 P= INF

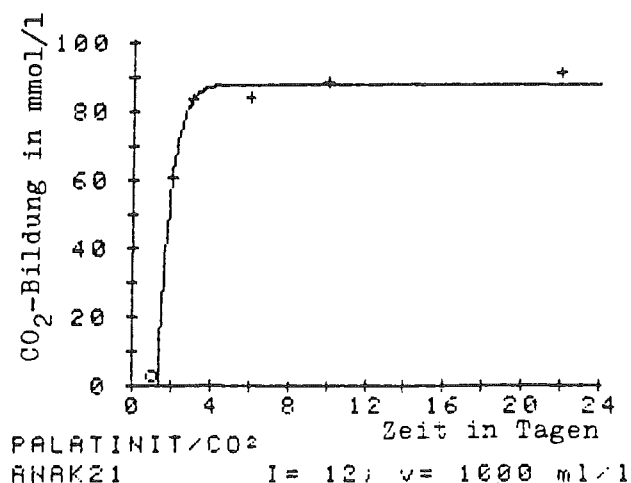


Abbildung 4 Zeitabhängigkeit des anaeroben Abbauverhaltens von Palatinit (hydrierte Isomaltulose)

3.0 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Routineuntersuchungen

Eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse findet sich in Tabelle 1. Übersichtstafeln mit den Ergebnissen der einzelnen Substanzuntersuchungen (konzentrationsabhängiges Verhalten unter anaeroben Bedingungen, Methananteil im Faulgas, Kurzbeurteilung des Verhaltens unter anaeroben Bedingungen) sind im Anhang zu diesem Bericht.

Für die Untersuchungen wurden Di-(2-ethylhexyl)-phthalat, Ethylacetat (Essigsäureethylester) und Pentachlorphenol als "Oekanal-Substanzen" der Firma Riedel de Haën, D-3016 Seelze 1/Hannover, die übrigen Chemikalien mit dem von uns höchst erreichbaren Reinheitsgrad als Testsubstanzen eingesetzt.

Außer den Reinsubstanzen wurde ein Schlamm-Flockungshilfsmittel ("ZETAG 67" der Firma Allied Colloids Manufacturing GmbH, D-2000 Hamburg 60) auf sein Verhalten unter anaeroben Bedingungen untersucht. Dieses enthält als Wirksubstanz ein kationisches polyacrylamidhaltiges Copolymer und wird in der hiesigen Kläranlage dem Faulschlamm zur Verbesserung der Entwässerbarkeit zugesetzt. Die Untersuchung dieses Substanzgemisches war erforderlich, weil die Faulmatrix für die Abbaubarkeitsuntersuchungen auf der Basis dieses Schlammes angesetzt wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, daß das Schlamm-Flockungshilfsmittel unter anaeroben Bedingungen "inert" bis "schwach abbaubar" ist.

Tabelle 1

ERGEBNISSE AUS DEN UNTERSUCHUNGEN ZUR PRÜFUNG DES ABBAU-
VERHALTENS ORGANISCHER SUBSTANZEN UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN

TESTSUBSTANZ	Untersuchter Konz.-Bereich		Beurteilung des Abbauverhaltens im untersuchten Konzentrationsbereich
	Substanz-Konz. in (g/l)	Δ org. gebundener Kohlenstoff in (mmol/l)	
Acetonitril	0 - 2,25	0 - 109,6	nach der CH ₄ -Entwicklung <u>schwach hemmend</u> ; nach der CO ₂ -Entwicklung <u>stärker hemmend</u> .
Di-(2-ethylhexyl)-phthalsäureester ¹⁾	0 - 0,45	0 - 27,7	nach der CH ₄ -Entwicklung <u>inert</u> ; nach der CO ₂ -Entwicklung <u>Hemmwirkung</u> .
Dodecyl-1-sulfonsäure ²⁾	0 - 0,45	0 - 21,6	bei kurzen Versuchszeiten und höheren Konz. <u>Hemmwirkung</u> ; nach längeren Versuchszeiten im ges. Konz.-Bereich <u>weitgehend inert</u> .
Dodecylbenzol-sulfonsäure ³⁾	0 - 0,45	0 - 24,8	bei niedriger Konzentration <u>inert</u> ; mit steigender Konzentration <u>zunehmend toxisch</u> .
Essigsäure-ethylester	0 - 2,25	0 - 102,2	<u>gut abbaubar</u> ohne nennenswerte Adaptationsphase.
Ethanol	0 - 2,70	0 - 117,2	<u>gut abbaubar</u> nach kurzer Adaptationsphase.
Monochloressigsäure	0 - 2,25	0 - 48,3	<u>toxisch</u>
Monochloressigsäure	0 - 1,17	0 - 24,7	<u>toxisch</u>
Oxalsäure ²⁾	0 - 2,03	0 - 45,0	anfangs <u>geringe Hemmung</u> ; zum Ende hin <u>geringer Abbau</u> .
Palatinit (hydrierte Isomaltulose)	0 - 2,25	0 - 74,5	<u>abbaubar</u> nach kurzer Adaptationsphase.
Pentachlorphenol ⁴⁾	0 - 0,45	0 - 25,4	bereits bei einer Konzentration von 50 mg/l <u>toxisch</u> ; innerhalb von 35 Tagen keine Erholung.
Pyridin ⁴⁾	0 - 0,45	0 - 29,6	<u>inert bis schwach toxisch</u> nach der CH ₄ -Entwicklung; <u>etwas stärker toxisch</u> nach der CO ₂ -Entwicklung.
Saccharose	0 - 2,25	0 - 89,4	<u>gut abbaubar</u> ohne nennenswerte Adaptationsphase.

1) - Suspension

2) - Natriumsalz eingewogen.

3) - Methylester verseift und nach Verkochnung des Methanols den pH-Wert der Lösung auf 7,5 eingestellt.

4) - Freie Säure bzw. Base eingewogen und dann mit NaOH bzw. HCl den pH-Wert 7,5 eingestellt.

4.0 Ergebnisse der Untersuchungen mit versuchsbegleitender, substanzspezifischer Analytik

Zur Absicherung der mit der Routinemethode auf indirektem Weg über die Faulgasmenge und -zusammensetzung erarbeiteten Ergebnisse wurden bei Untersuchungen mit den Modellsubstanzen Methanol und Ethylacetat (Essigsäureethylester) Abbautests mit zusätzlicher versuchsbegleitender, substanzspezifischer Analytik vorgenommen. Diese beiden Substanzen wurden ausgewählt wegen der relativ günstigen Möglichkeit, sie direkt aus Proben der betreffenden Reaktionsmischungen gaschromatographisch, mittels der "Head-space"-Technik (7) mit zufriedenstellender analytischer Genauigkeit zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden die Reaktionsmischungen jeweils in einer eigens dafür hergerichteten Versuchsanlage im 10-kg-Maßstab angesetzt. Während des jeweiligen Versuchslaufes wurden am Ende eines jeden Faulgas-Meßabschnitts aliquote Proben der Reaktionsmischungen abgenommen und auf ihre Restgehalte an der Testsubstanz untersucht.

Methanol als Testsubstanz

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen graphische Darstellungen der wesentlichsten Zusammenhänge zwischen den Versuchsparametern bei der Untersuchung des Methanols. Besonders aus Abbildung 6 geht hervor, daß mit dem Verschwinden des Methanols aus der Reaktionsmischung eine weitgehend lineare Zunahme der produzierten Faulgas- (bzw. Methan-/Kohlendioxid-) menge erfolgte.

Tabelle 2 gibt die während des Versuchslaufes kumulativ vorgenommenen Bilanzierungen des in Form der Testsubstanz eingesetzten Kohlenstoffes wieder. Während des Versuchslaufes sanken die Summen der Restmethanol-, Methan- und Kohlendioxid-Kohlenstoffanteile zunächst auf ein Minimum und stiegen dann allmählich wieder an. Die zunächst vorzufindenden, auf den Testsubstanz-Kohlenstoff bezogenen defizitären Bilanzierungen dürften auf die intermediäre Bildung von Stoffwechselprodukten zurückzu-

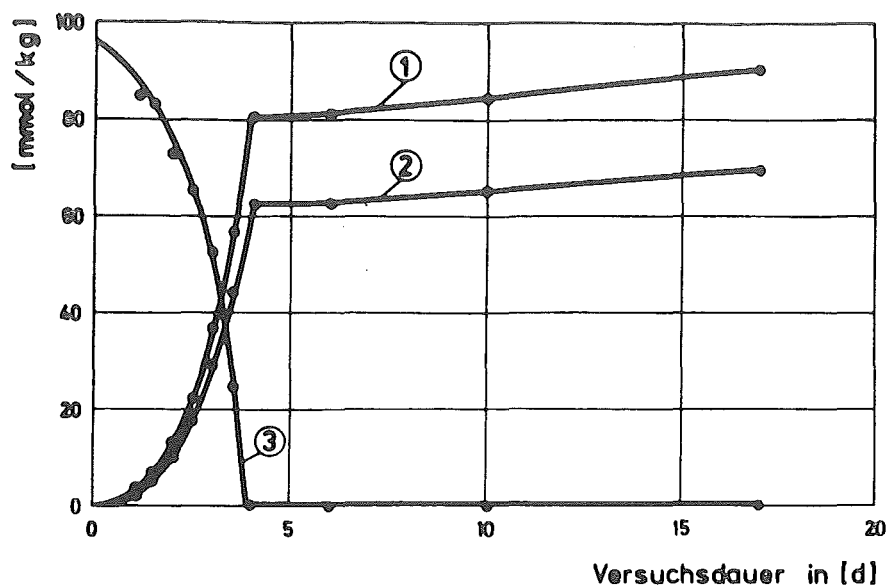


Abbildung 5: Faulgas- bzw. Methanmengen und Methanol-Restkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit.

- 1 = Faulgas in mmol/kg
- 2 = Methan in mmol/kg
- 3 = Methanol-Kohlenstoff in mmol/kg

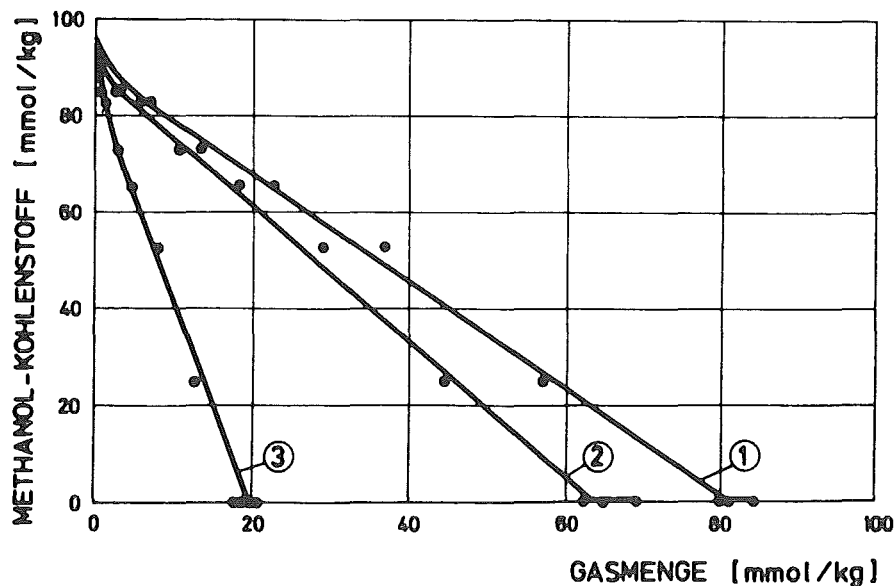


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen den Methanol-Restkonzentrationen und den produzierten Gasmengen bis zum völligen Verbrauch des Methanols (ca. 4 d).

- 1 = Faulgas
- 2 = Methan
- 3 = Kohlendioxid

Tabelle 2 Kohlenstoffbilanzierung bei der Prüfung
des Abbauverhaltens von Methanol

Versuchs- dauer in Tagen (d)	I Methanol—C (mmol/kg)	II CH ₄ —C (mmol/kg)	III CO ₂ —C (mmol/kg)	Summe aus I, II, III (mmol/kg)
0	95,7	0	0	95,7
1,1	84,8	2,6	0,5	87,9
1,5	82,8	5,7	1,2	89,7
2,0	72,9	10,6	2,7	86,2
2,5	65,3	18,0	4,6	87,9
3,0	52,6	29,0	7,9	89,5
3,5	24,9	44,4	12,5	81,8
4,0	0,1	62,3	18,0	80,4
6,0	0,1	62,3	18,4	80,8
10,0	0,1	64,9	19,4	84,4
17,0	0,1	69,1	20,7	89,9

führen sein, die mit den durchgeführten Analysen nicht erfaßt wurden.

Am Versuchsende waren jedoch von den am Versuchsanfang eingesetzten 95,7 mmol/kg Methanol-Kohlenstoff 89,9 mmol/kg in Faulgas, entsprechend einer Ausbeute von ca. 94%, umgesetzt worden.

Ethylacetat (Essigsäureethylester) als Testsubstanz

Die Zusammenhänge zwischen den wichtigsten Parametern des Versuches mit Ethylacetat als Testsubstanz sind in den Abbildungen 7 und 8 graphisch dargestellt. Da damit zu rechnen war, daß

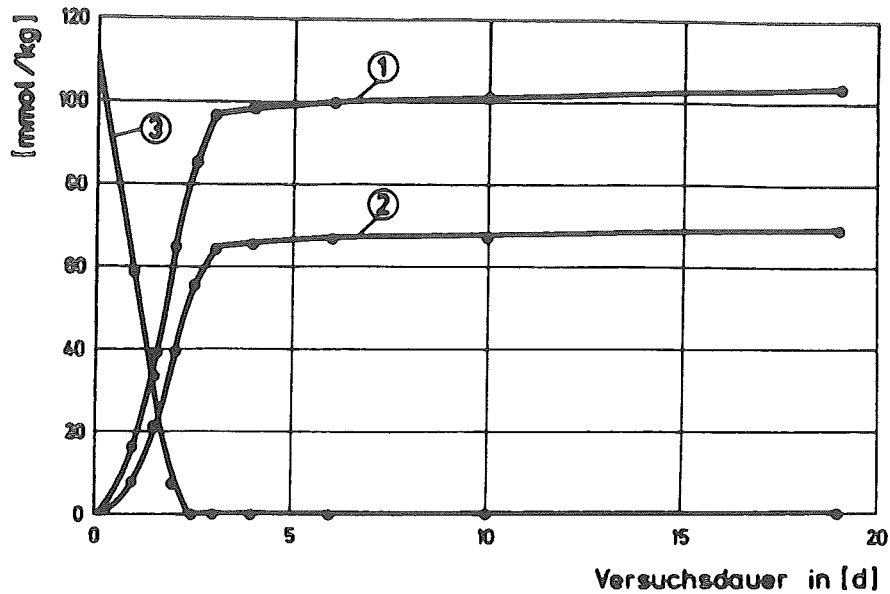


Abbildung 7: Faulgas- bzw. Methanmengen und Ethylacetat-Restkonzentrationen (einschl. des infolge von Hydrolysevorgängen gebildeten Ethanols) in Abhängigkeit von der Zeit.

1 = Faulgas in mmol/kg; 2 = Methan in mmol/kg;
3 = Ethylacetat-/Ethanol-Kohlenstoff in mmol/kg

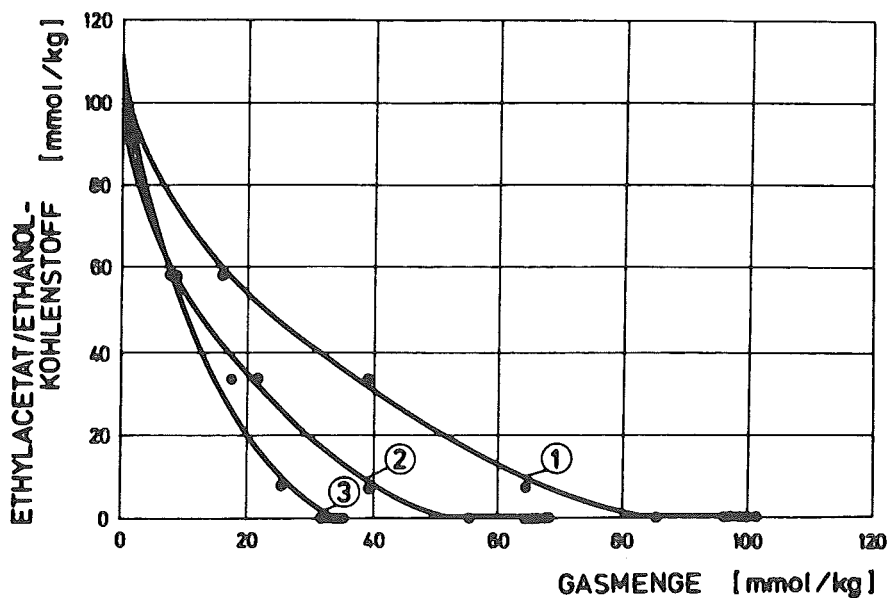


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen den Ethylacetat-Restkonzentrationen (einschl. des infolge von Hydrolysevorgängen gebildeten Ethanols) und den während des Versuchslaufes produzierten Gasmengen.

1 = Faulgas; 2 = Methan; 3 = Kohlendioxid

beim anaeroben Abbau von Ethylacetat dieses zunächst zu Essigsäure und Ethanol hydrolysiert wird, wurden nicht nur die Ethylacetat-, sondern auch die Ethanolkonzentrationen in der Reaktionsmischung während des Versuchslaufes verfolgt.

Abbildung 8 zeigt sehr deutlich, wie mit zunehmender Faulgas- bzw. Methan-/Kohlendioxid-Produktion die Konzentration an Ethylacetat-/Ethanol-Kohlenstoff in der Reaktionsmischung kleiner wurde. Der teilweise nichtlineare Verlauf dieser Kurven ist damit zu erklären, daß mit dem Ethylacetat-/Ethanol-Kohlenstoffrestgehalt in der Reaktionsmischung der Kohlenstoffanteil der abhydrolysierten und noch nicht anaerob zersetzten Essigsäure nicht erfaßt ist. Dies geht auch aus den in Tabelle 3 zusammengestellten, kumulativen Bilanzierungen des auf verschiedene Komponenten des Systems verteilten Kohlenstoffes hervor, da Ethylacetat nach 2 Tagen, Ethanol nach 2,5 Tagen nicht mehr in nennenswerten Mengen in der Reaktionsmischung nachzuweisen waren.

Tabelle 3 Kohlenstoffbilanzierung bei der Prüfung des Abbauverhaltens von Essigsäureethylester (Ethylacetat)

Abkürzungen: EtAc = Ethylacetat
EtOH = Ethanol

Versuchsdauer in Tagen (d)	I EtAc—C (mmol/kg)	II EtOH—C (mmol/kg)	III CH ₄ —C (mmol/kg)	IV CO ₂ —C (mmol/kg)	Summe aus I, II, III, IV (mmol/kg)
0	113,5	0	0	0	113,5
0,9	15,9	42,6	7,7	8,3	74,5
1,5	0,4	33,0	21,4	17,5	72,3
2,0	0,01	7,5	39,4	25,2	72,1
2,5	0,01	0,01	55,5	29,9	85,4
3,0	0,01	0,01	64,4	32,0	96,4
4,0	0,01	0,01	65,4	32,4	97,4
6,0	0,01	0,01	66,3	32,7	99,0
10,0	0,01	0,01	67,0	33,2	100,2
19,0	0,01	0,01	67,7	34,0	101,7

Am Versuchsende waren 101,7 mmol/kg von den anfangs eingesetzten 113,5 mmol/kg Testsubstanz-Kohlenstoff, entsprechend einer Ausbeute von ca. 90%, in Faulgas übergeführt worden.

Bei den beiden Testsubstanzen Methanol und Ethylacetat wird offensichtlich ein Teil des mit diesen eingebrachten Kohlenstoffes zum Aufbau von Biomasse verwendet und somit nur mit Verzögerung in Faulgas übergeführt. Dieser verzögerte Abbauprozess ist nach den angesetzten Versuchszeiten noch nicht abgeschlossen, was die Abweichung der Faulgas-Ausbeuten von 100% erklärt.

5.0 Literatur

- (1) Wagner, R. u. Bräutigam, H.-J.: Entwicklung und Erprobung einer Methode zur Untersuchung des Abbauverhaltens von organischen Substanzen unter anaeroben Milieubedingungen. Zwischen- und Endberichte zum BMFT-Forschungsvorhaben mit dem Förderungskennzeichen 03 7221, Februar 1981.
- (2) Rippen, G., Zietz, E., Schönborn, W., Frische, R. u. Klöpffer, W.: Merkblätter über Referenzchemikalien. Herausgegeben vom Battelle-Institut e.V., Frankfurt/Main im Auftrag der KFA-Jülich, Projektträgerschaft Umweltchemikalien, 2. überarbeitete Auflage, November 1982.
- (3) Wagner, R.: Abbaubarkeit und Persistenz. Vom Wasser 40, 335-367 (1973).
- (4) Wagner, R.: Grundlagen der statistischen Behandlung einfacher linearer Korrelationen. Vom Wasser 54, 273-292 (1980).
- (5) Wagner, R. u. Jenkins, E.-B.: Untersuchungen zur differenzierenden Bewertung einer Methode zur Prüfung des Abbauverhaltens von organischen Substanzen unter anaeroben Bedingungen. Zwischenbericht zum BMFT-Forschungsvorhaben mit dem Förderungskennzeichen 03 7286, Oktober 1982.
- (6) Wagner, R.: Untersuchung der biochemischen Abbaubarkeit von chemischen Reinsubstanzen, insbesondere der Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Abbaubarkeit. Endbericht zum UBA-Forschungsvorhaben "Wasser 102 06 202", April 1982.
- (7) Kolb, B.: Applied Head-space Gas Chromatography, 1. Auflage, Heyden & Son GmbH, Rheine 1980.

Bundesminister für Forschung und Technologie

Anhang zum Forschungsbericht (03 7286)
(Substanzdatenblätter)

Untersuchungen zur differenzierenden Bewertung einer
Methode zur Prüfung des Abbauverhaltens von
organischen Substanzen unter anaeroben Bedingungen

von

Prof. Dr.-Ing. R. Wagner

und

Dipl.-Chem. Dr. E.-B. Jenkins

Institut für Siedlungswasserbau,
Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität
Stuttgart

Institutsleiter:

Prof. Dr.-Ing. K.-H. Hunken

November 1983

ANHANG ZUM FORSCHUNGSBERICHT 03 7286

Übersichtstafeln mit den Ergebnissen
der einzelnen Substanzuntersuchungen

Alphabetisches Register

<u>Testsubstanzen</u>	<u>Tafeln</u>
Acetonitril	001
Dodecylbenzolsulfonsäure	002
Dodecylsulfonsäure	003
Essigsäureethylester	004, 005
Ethanol	006
Ethylhexylphthalat	007, 008
Harnstoff	009
Maltose	010
Monochloressigsäure	011, 012
Oxalsäure	013
Palatinit (hydrierte Isomaltulose)	014, 015
Pentachlorphenol	016
Pyridin	017
Saccharose	018
Schlamm-Flockungshilfsmittel	019

ANHANG ZUM FORSCHUNGSBERICHT 03 7286

Übersichtstafeln mit den Ergebnissen
der einzelnen Substanzuntersuchungen

Formelregister

<u>Summenformeln</u>	<u>Testsubstanzen / Tafelnummern</u>
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ Harnstoff / 009
$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ Oxalsäure / 013
$\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}_2$ Monochloressigsäure / 011, 012
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ Acetonitril / 001
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ Ethanol / 006
$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ Essigsäureethylester / 004, 005
$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ Pyridin / 017
$\text{C}_6\text{HCl}_5\text{O}$ Pentachlorphenol / 016
$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ Maltose / 010
$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ Saccharose / 018
$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{S}$ Dodecyl-1-sulfonsäure / 003
$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ Palatinit (hydrierte Isomaltulose) / 014, 015
$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{S}$ Dodecylbenzolsulfonsäure / 002
$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ Phthalsäure-bis-2-ethylhexylester / 007,008 (Ethylhexylphthalat)

Tabelle 1

ERGEBNISSE AUS DEN UNTERSUCHUNGEN ZUR PRÜFUNG DES ABBAU-
VERHALTENS ORGANISCHER SUBSTANZEN UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN

TESTSUBSTANZ	Untersuchter Konz.-Bereich		Beurteilung des Abbauverhaltens im untersuchten Konzentrationsbereich
	Substanz-Konz. in (g/l)	≙ org. gebundener Kohlenstoff in (mmol/l)	
Acetonitril	0 - 2,25	0 - 109,6	nach der CH ₄ -Entwicklung <u>schwach hemmend</u> ; nach der CO ₂ -Entwicklung <u>stärker hemmend</u> .
Di-(2-ethylhexyl)-phthalsäureester ¹⁾	0 - 0,45	0 - 27,7	nach der CH ₄ -Entwicklung <u>inert</u> ; nach der CO ₂ -Entwicklung <u>Hemmwirkung</u> .
Dodecyl-1-sulfonsäure ²⁾	0 - 0,45	0 - 21,6	bei kurzen Versuchszeiten und höheren Konz. <u>Hemmwirkung</u> ; nach längeren Versuchszeiten im ges. Konz.-Bereich <u>weitgehend inert</u> .
Dodecylbenzol-sulfonsäure ³⁾	0 - 0,45	0 - 24,8	bei niedriger Konzentration <u>inert</u> ; mit steigender Konzentration <u>zunehmend toxisch</u> .
Essigsäure-ethylester	0 - 2,25	0 - 102,2	<u>gut abbaubar</u> ohne nennenswerte Adaptationsphase.
Ethanol	0 - 2,70	0 - 117,2	<u>gut abbaubar</u> nach kurzer Adaptationsphase.
Monochloressigsäure	0 - 2,25	0 - 48,3	<u>toxisch</u>
Monochloressigsäure	0 - 1,17	0 - 24,7	<u>toxisch</u>
Oxalsäure ²⁾	0 - 2,03	0 - 45,0	anfangs <u>geringe Hemmung</u> ; zum Ende hin <u>geringer Abbau</u> .
Palatinit (hydrierte Isomaltulose)	0 - 2,25	0 - 74,5	<u>abbaubar</u> nach kurzer Adaptationsphase.
Pentachlorphenol ⁴⁾	0 - 0,45	0 - 25,4	bereits bei einer Konzentration von 50 mg/l <u>toxisch</u> ; innerhalb von 35 Tagen keine Erholung.
Pyridin ⁴⁾	0 - 0,45	0 - 29,6	<u>inert bis schwach toxisch</u> nach der CH ₄ -Entwicklung; etwas <u>stärker toxisch</u> nach der CO ₂ -Entwicklung.
Saccharose	0 - 2,25	0 - 89,4	<u>gut abbaubar</u> ohne nennenswerte Adaptationsphase.

1) - Suspension

2) - Natriumsalz eingewogen.

3) - Methyl ester verseift und nach Verkoehung des Methanols den pH-Wert der Lösung auf 7,5 eingestellt.

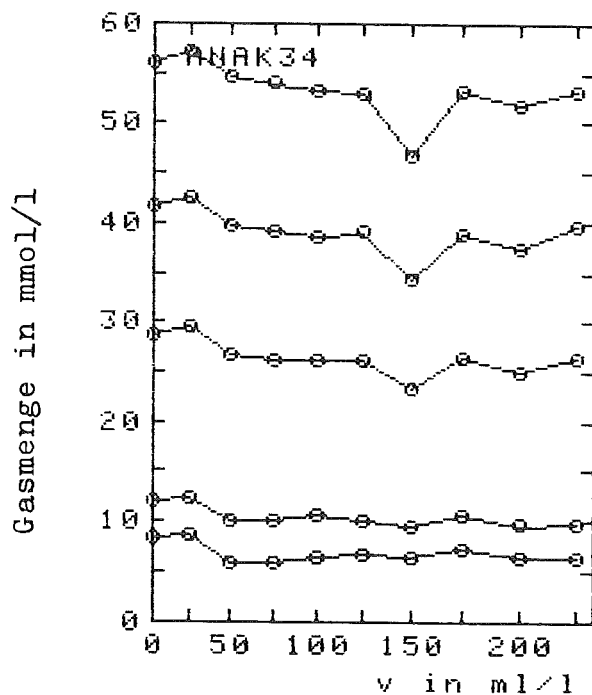
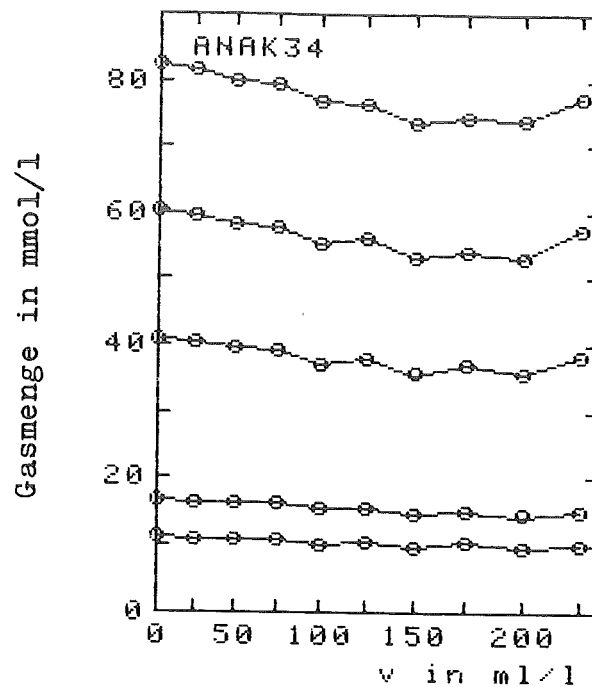
4) - Freie Säure bzw. Base eingewogen und dann mit NaOH bzw. HCl den pH-Wert 7,5 eingestellt.

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

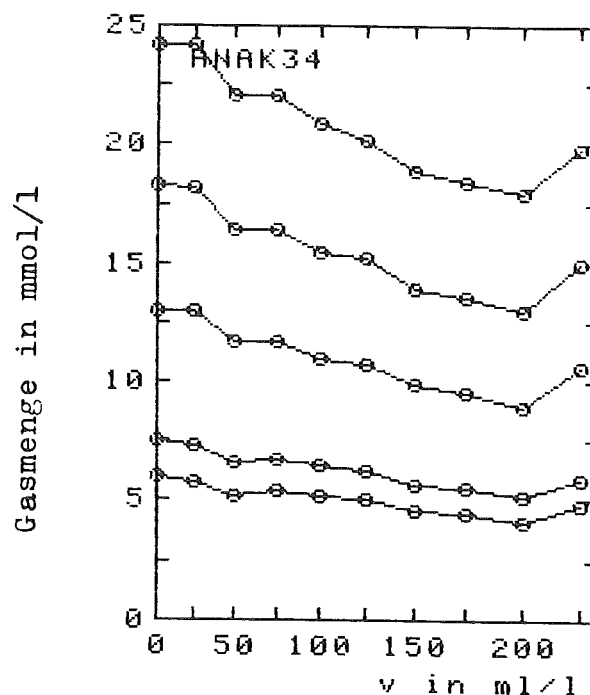
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

ACETONITRIL

KURVE 5: 23.00 d
KURVE 4: 14.00 d
KURVE 3: 8.00 d
KURVE 2: 2.00 d
KURVE 1: 1.00 d

ACETONITRIL/CH₄

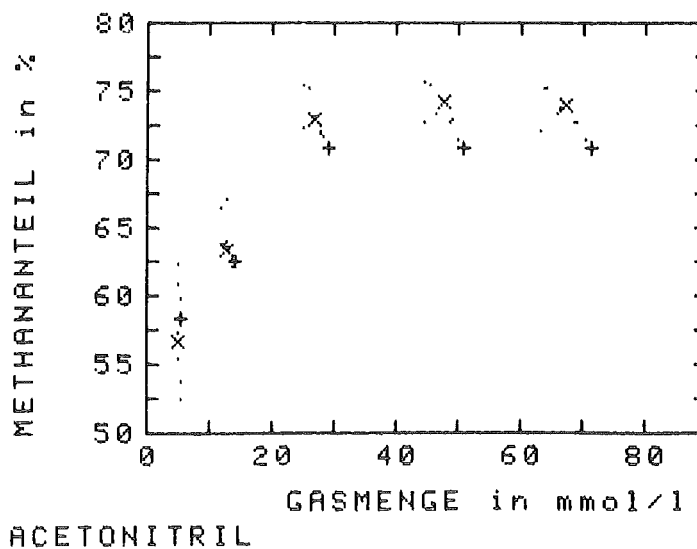
ACETONITRIL/FG

ACETONITRIL/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Nach der CH₄-Entwicklung
schwach hemmend; nach der
CO₂-Entwicklung stärker
hemmend.

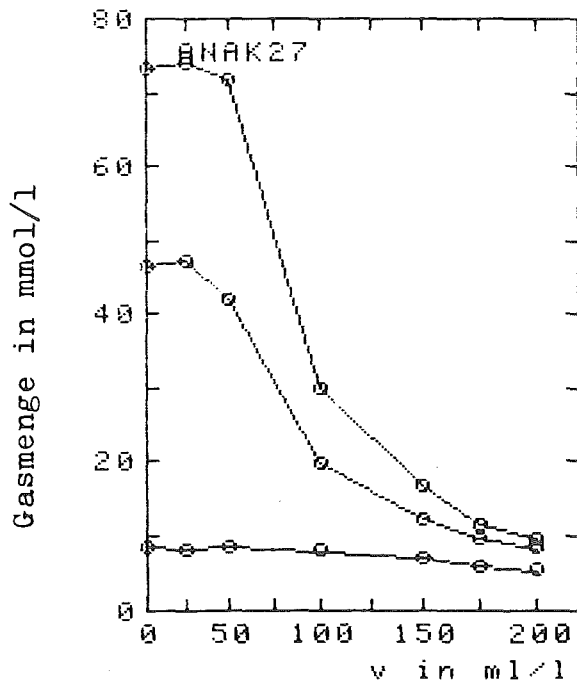


Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

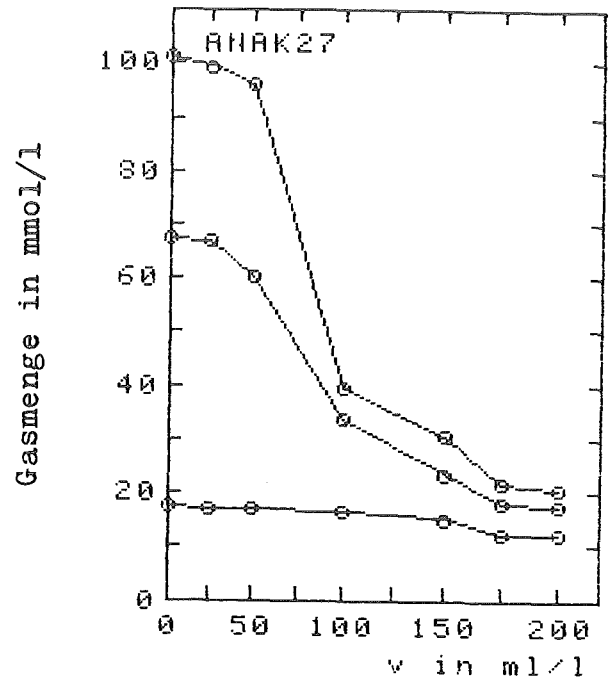
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

DODECYLBENZOLSULFONSAURE

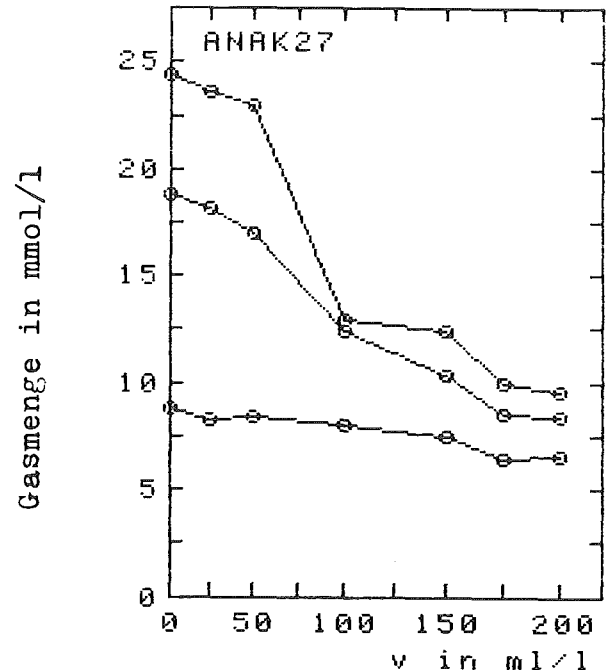
KURVE 3: 16.25 d
KURVE 2: 12.25 d
KURVE 1: 5.00 d



DODECYLBENZOLSULFONSAURE/CH₄



DODECYLBENZOLSULFONSAURE/FG

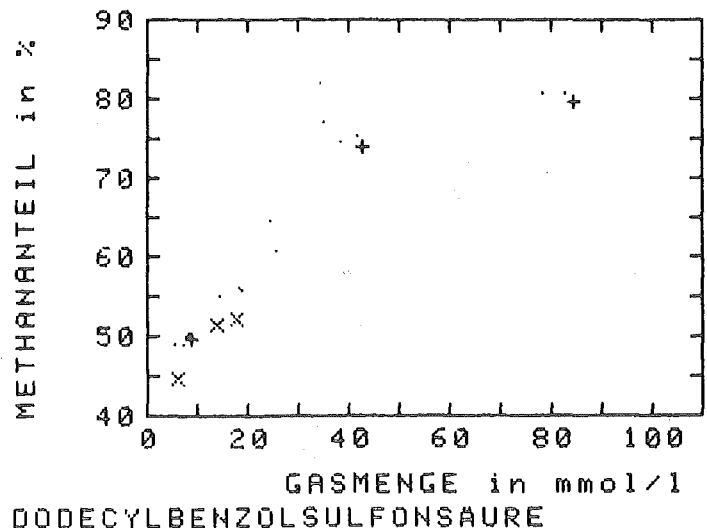


DODECYLBENZOLSULFONSAURE/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Bei niedriger Konzentration
inert; mit steigender Kon-
zentration zunehmende Toxi-
zität.



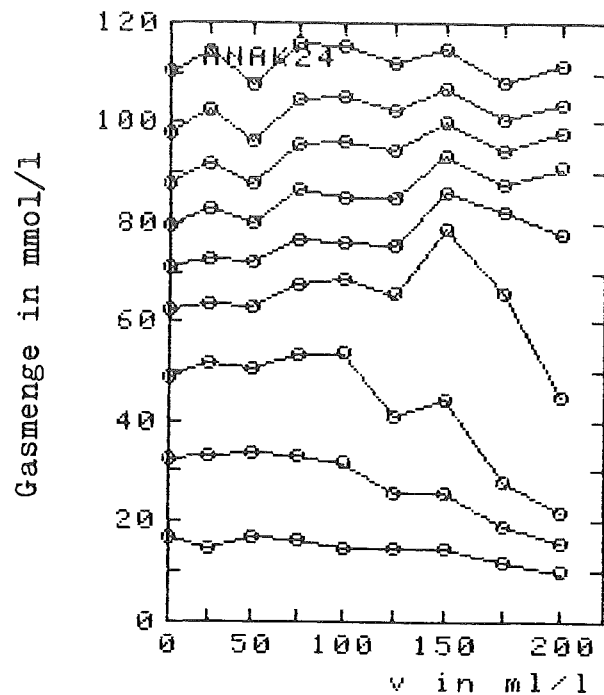
TAFEL 003

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

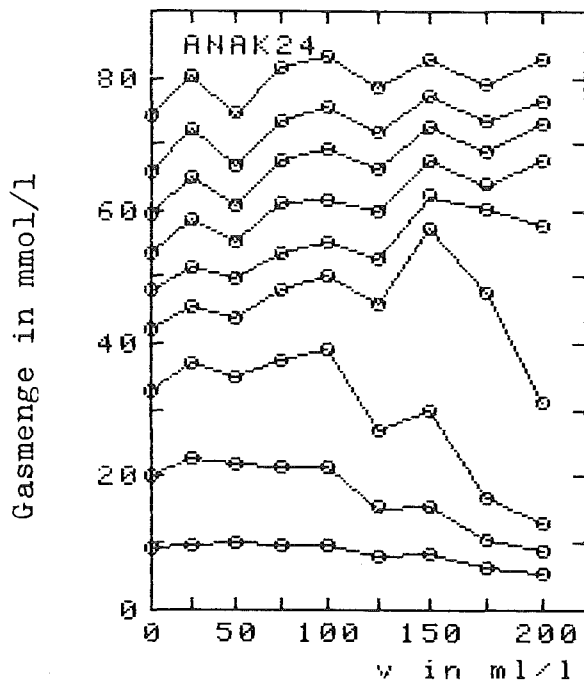
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

DODECYLSULFONSAURE

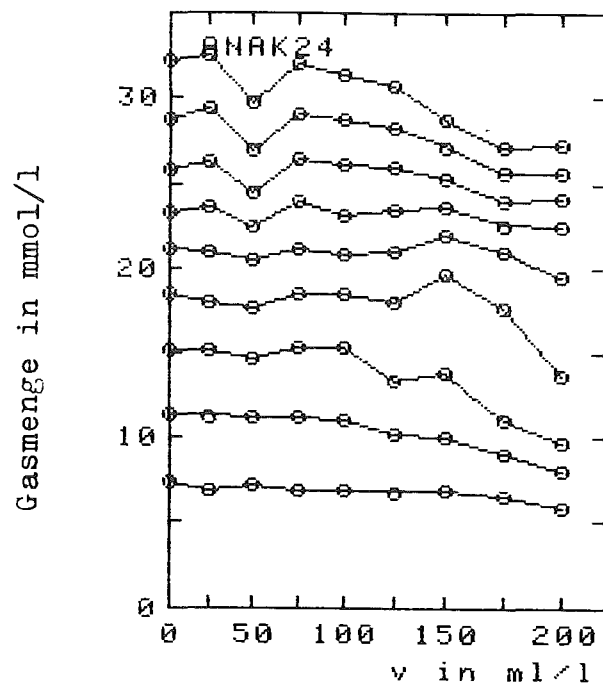
KURVE	9:	52.00 d
KURVE	8:	41.00 d
KURVE	7:	34.00 d
KURVE	6:	27.00 d
KURVE	5:	21.00 d
KURVE	4:	17.00 d
KURVE	3:	11.00 d
KURVE	2:	6.00 d
KURVE	1:	2.00 d



DODECYLSULFONSAURE/FG



DODECYLSULFONSAURE/CH₄



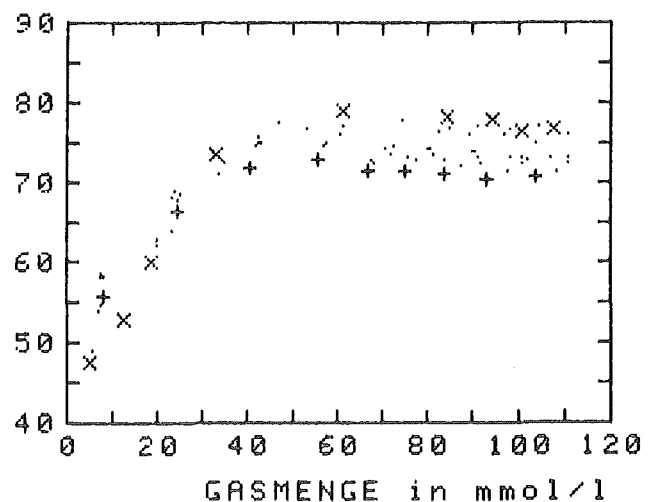
DODECYLSULFONSAURE/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Bei kurzen Versuchszeiten u.
höheren Konz. Hemmwirkung;
n. längeren Versuchszeiten
im ges. Konz.-Bereich weit-
gehend inert.

METHANANTEIL in %



DODECYLSULFONSAURE

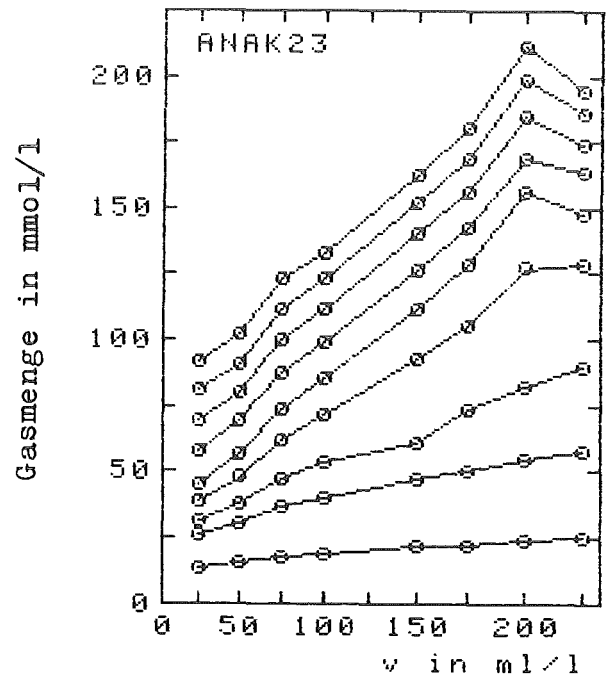
TAFEL 004

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

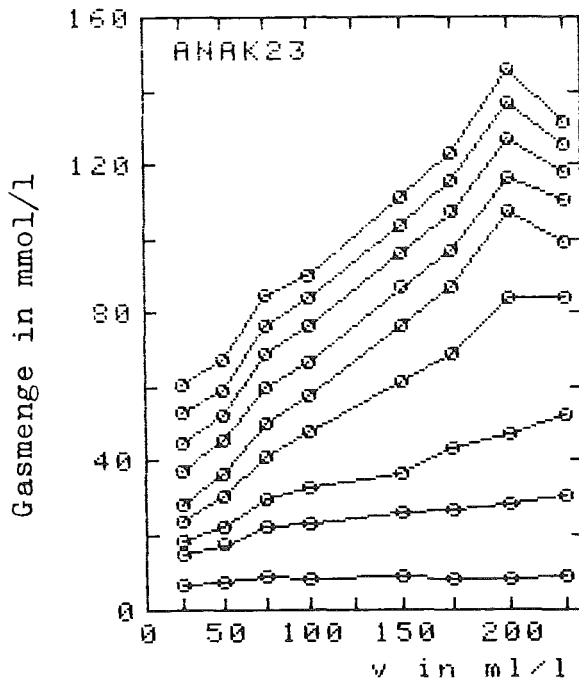
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

ESSIGSÄUREETHYLESTER

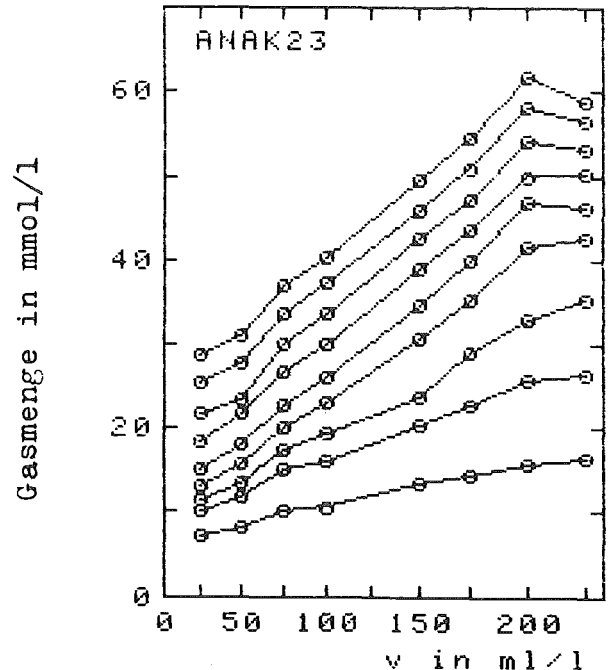
KURVE	9:	36.00 d
KURVE	8:	28.00 d
KURVE	7:	20.00 d
KURVE	6:	13.00 d
KURVE	5:	8.00 d
KURVE	4:	6.00 d
KURVE	3:	4.00 d
KURVE	2:	3.00 d
KURVE	1:	1.00 d



ESSIGSÄUREETHYLESTER/FG



ESSIGSÄUREETHYLESTER/CH₄



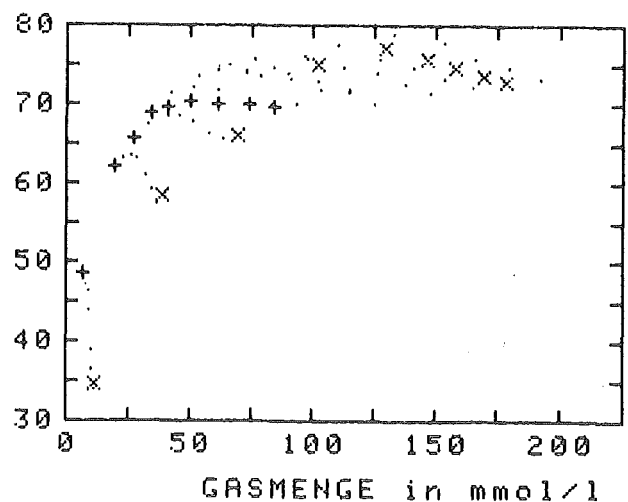
ESSIGSÄUREETHYLESTER/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Gut abbaubar ohne nennens-
werte Adaptationsphase.

METHANANTEIL in %



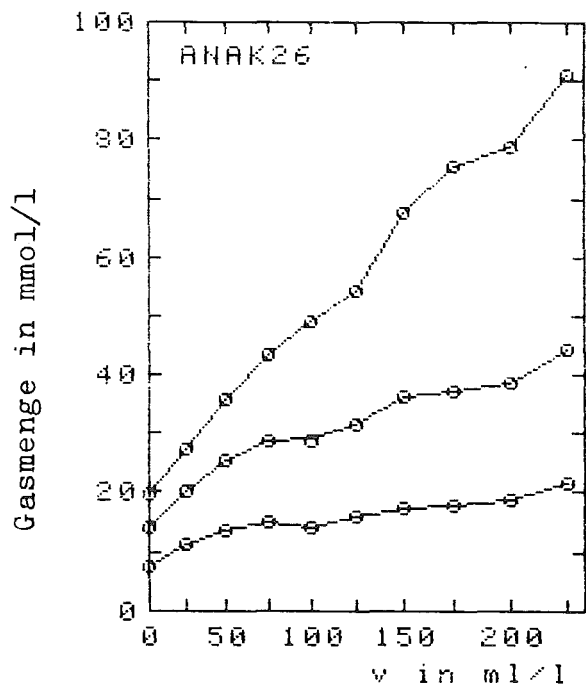
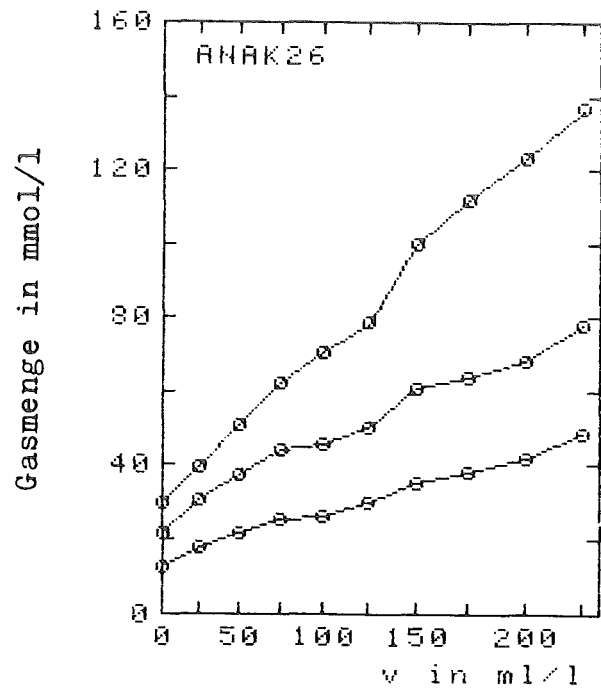
ESSIGSÄUREETHYLESTER

Konzentrationsabhängigkeit der Gasproduktion:

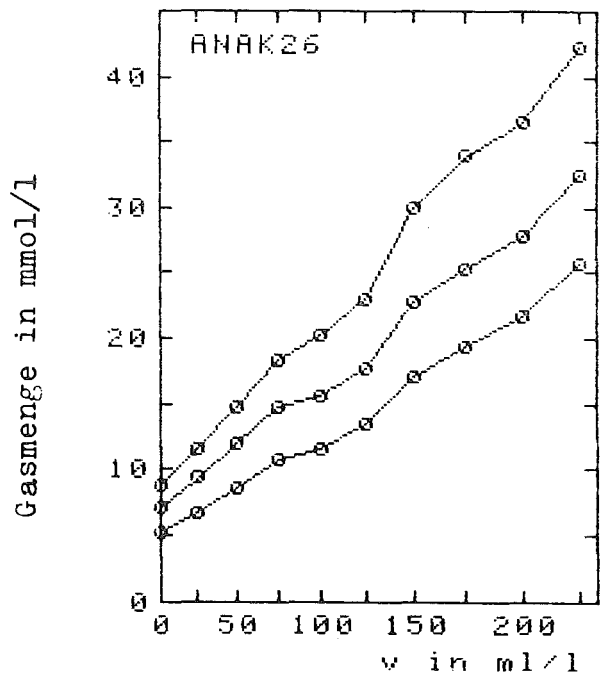
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

ESSIGSAUREETHYLESTER

KURVE 3: 8.00 d
KURVE 2: 5.00 d
KURVE 1: 2.00 d

ESSIGSAUREETHYLESTER/CH₄

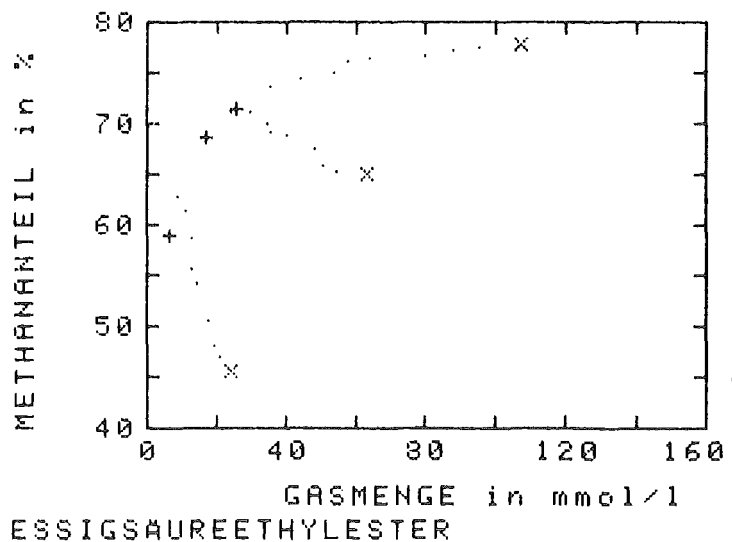
ESSIGSAUREETHYLESTER/FG

ESSIGSAUREETHYLESTER/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Gut abbaubar ohne nennenswerte Adaptationsphase.

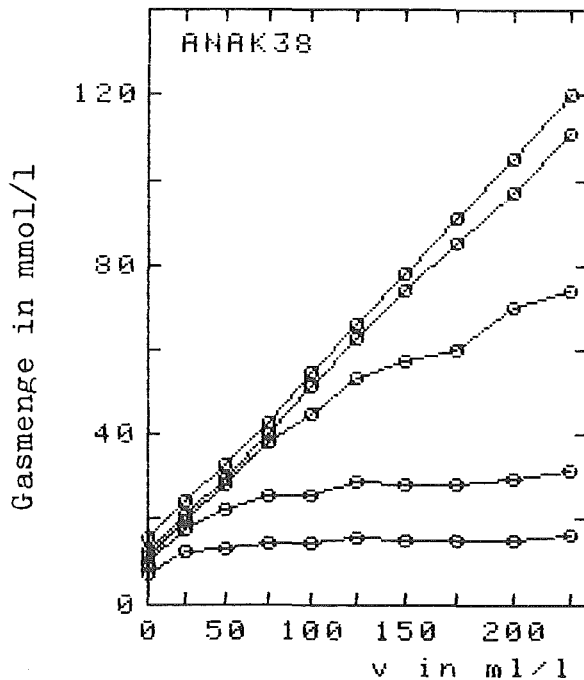


Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

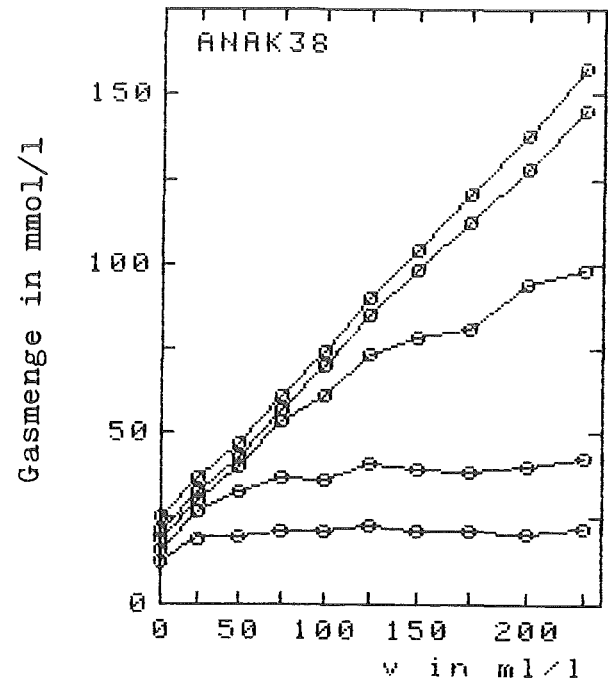
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

ETHANOL

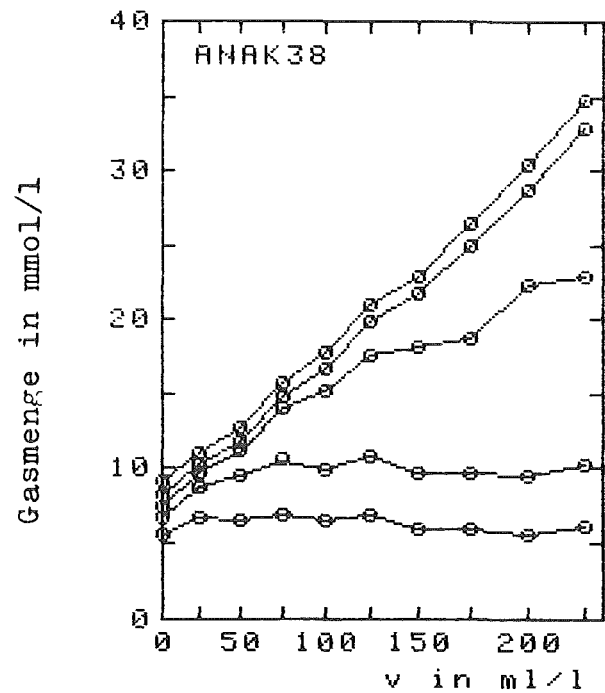
KURVE	5:	7.00 d
KURVE	4:	5.00 d
KURVE	3:	4.00 d
KURVE	2:	3.00 d
KURVE	1:	2.00 d



ETHANOL/CH₄



ETHANOL/FG

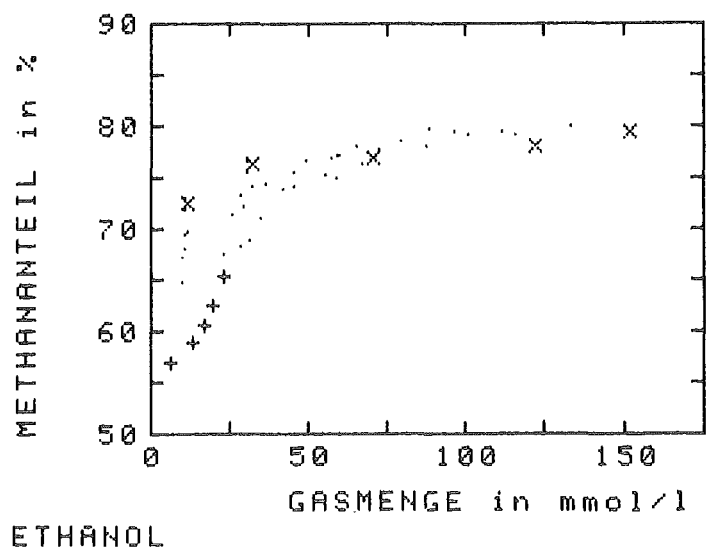


ETHANOL/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Gut abbaubar nach kurzer
Adaptationsphase

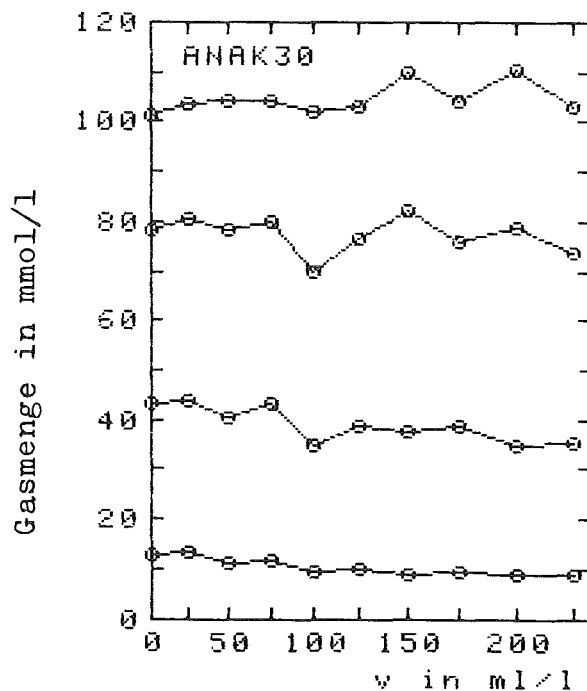


Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

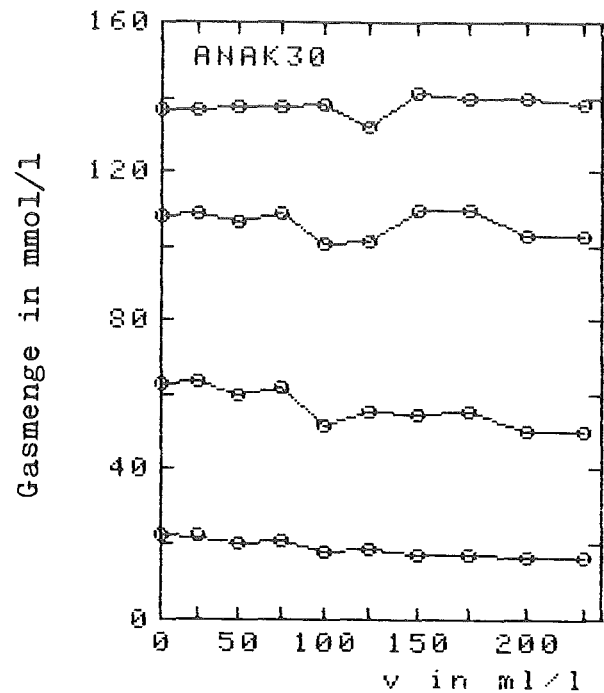
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

ETHYLHEXYLPHTHALAT

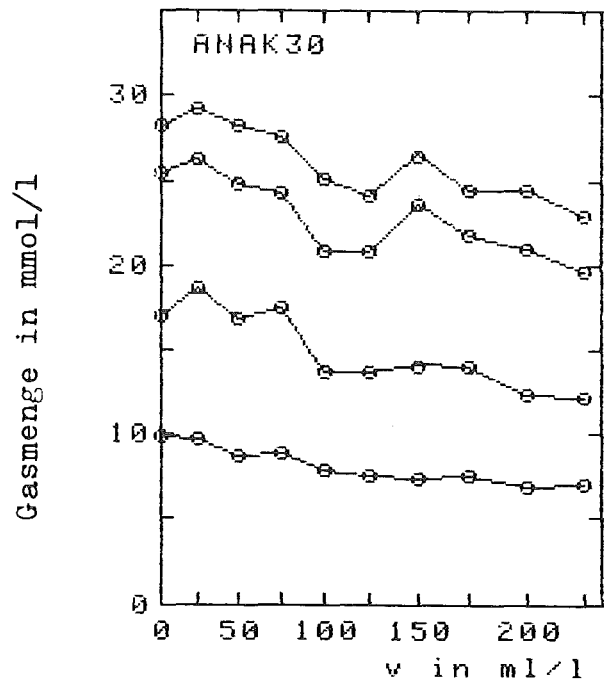
KURVE 4: 16.00 d
KURVE 3: 13.00 d
KURVE 2: 10.00 d
KURVE 1: 3.00 d



ETHYLHEXYLPHTHALAT/CH₄



ETHYLHEXYLPHTHALAT/FG

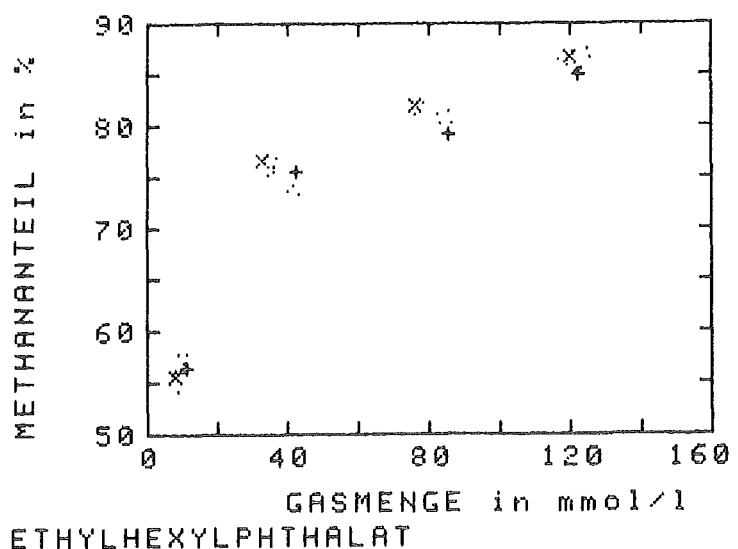


ETHYLHEXYLPHTHALAT/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Nach der CH₄-Entwicklung
inert; nach der CO₂-Ent-
wicklung Hemmwirkung.



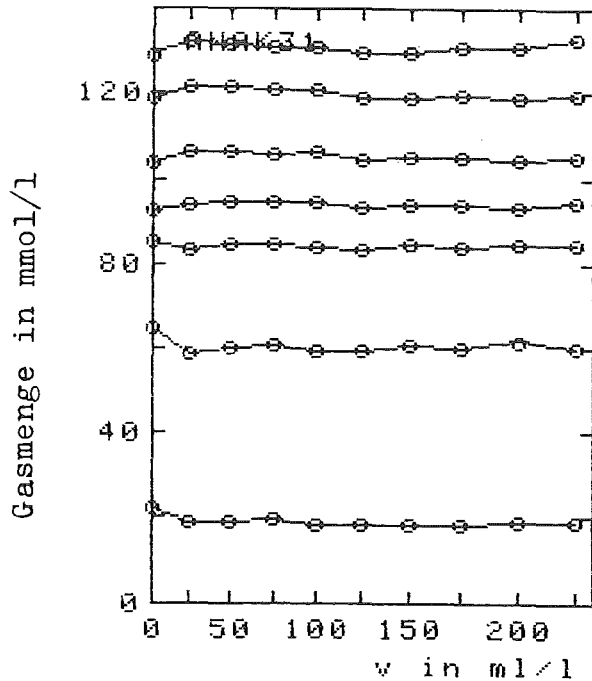
TAFEL 008

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

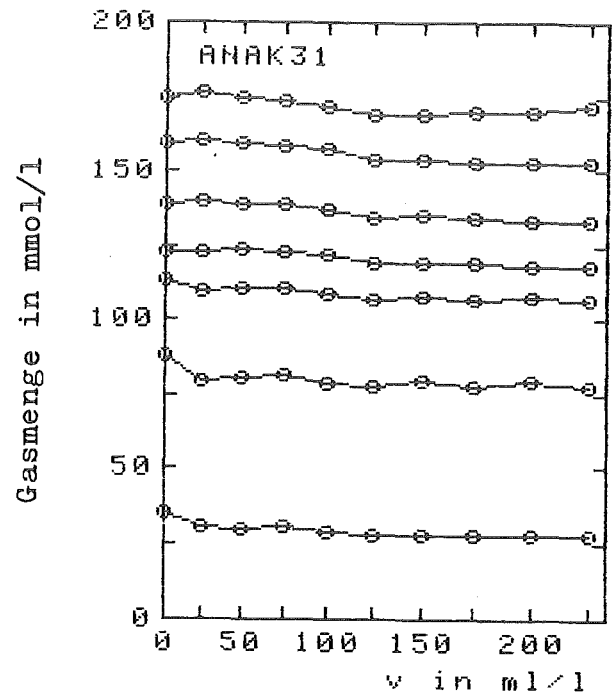
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

ETHYLHEXYLPHTHALAT

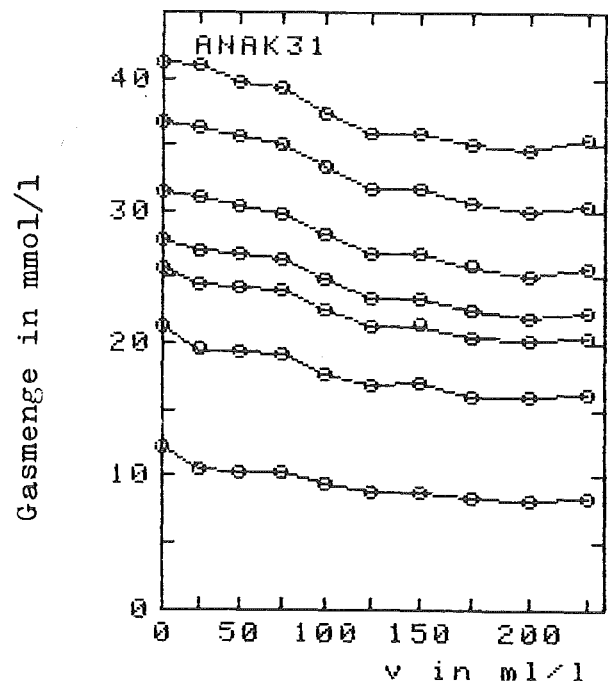
KURVE 7: 38.00 d
KURVE 6: 29.00 d
KURVE 5: 17.00 d
KURVE 4: 10.00 d
KURVE 3: 8.00 d
KURVE 2: 6.00 d
KURVE 1: 3.00 d



ETHYLHEXYLPHTHALAT/CH₄



ETHYLHEXYLPHTHALAT/FG

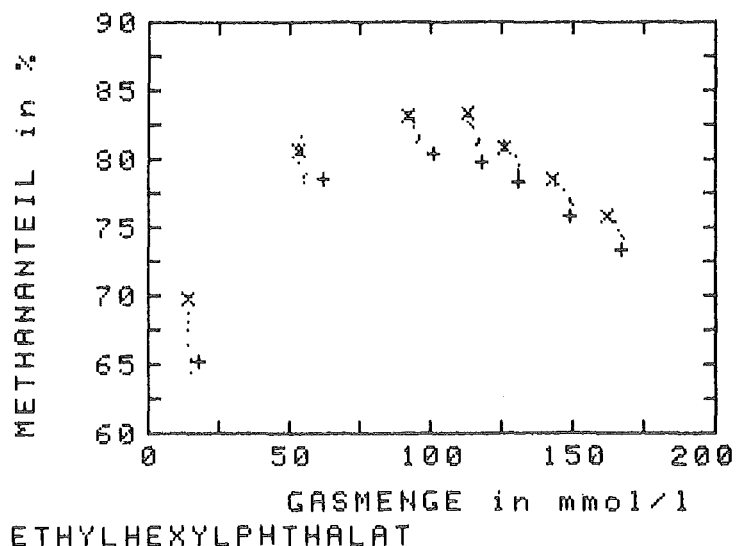


ETHYLHEXYLPHTHALAT/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

nach der CH₄-Entwicklung
inert; nach der CO₂-Ent-
wicklung Hemmwirkung.



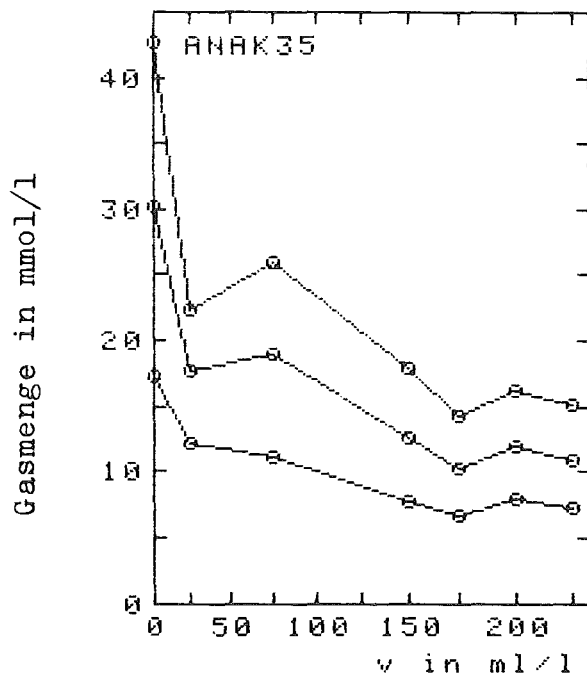
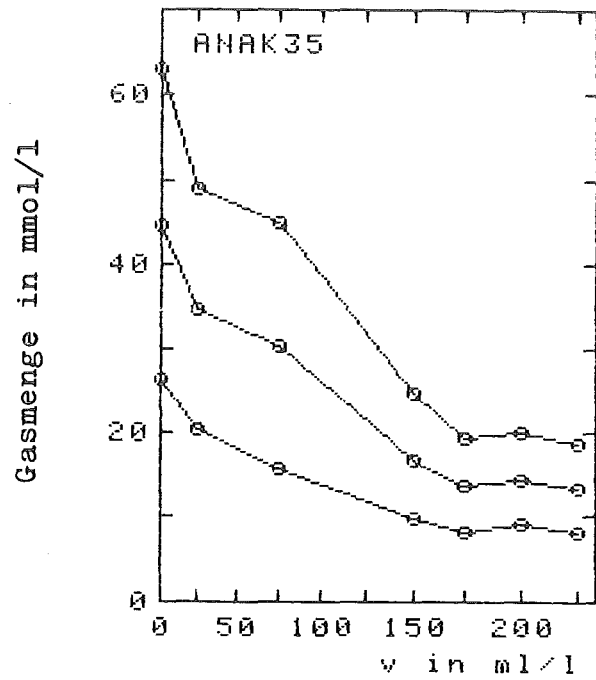
TAFEL 009

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

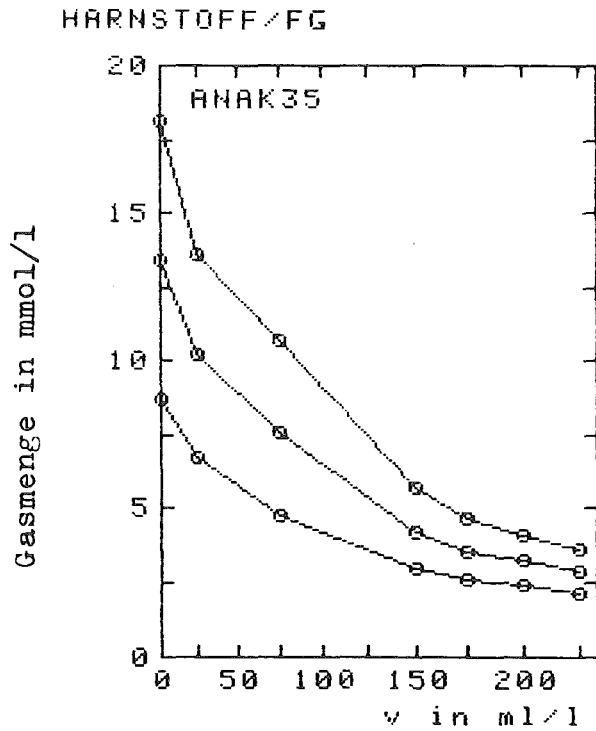
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

HARNSTOFF

KURVE 3: 20.00 d
KURVE 2: 12.00 d
KURVE 1: 6.00 d



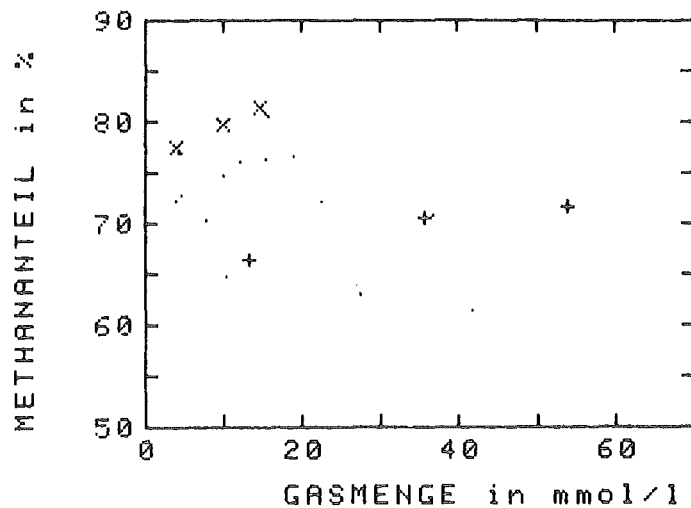
HARNSTOFF/CH₄



HARNSTOFF/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:



HARNSTOFF

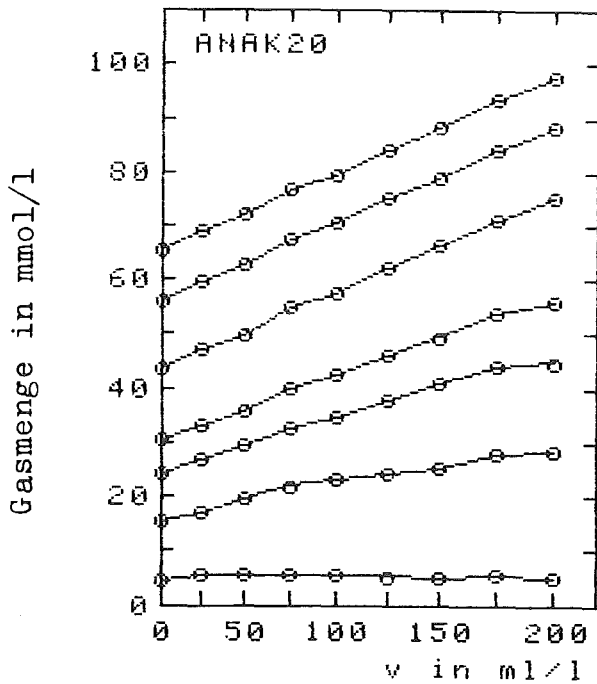
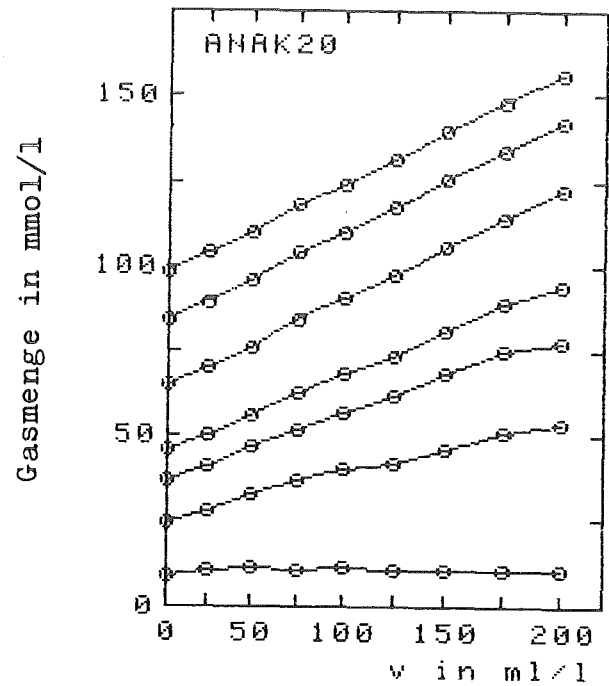
TAFEL C10

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

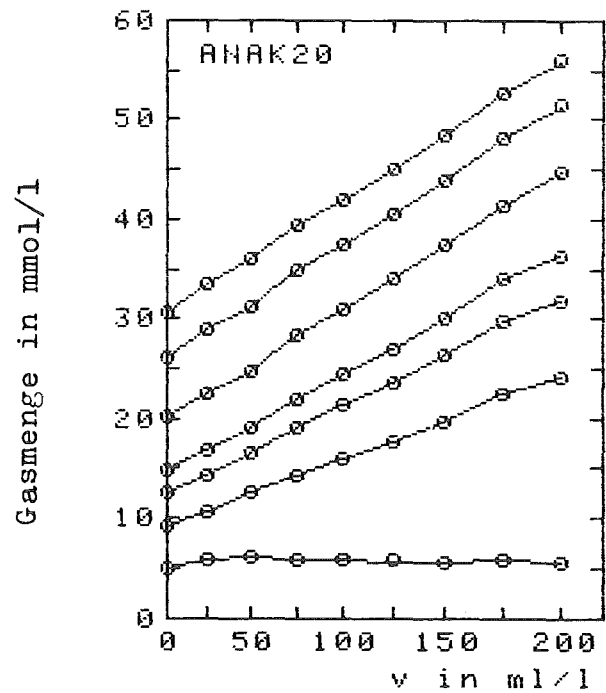
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

MALTOSE

KURVE 7: 22.29 d
KURVE 6: 14.29 d
KURVE 5: 7.29 d
KURVE 4: 3.29 d
KURVE 3: 2.29 d
KURVE 2: 1.29 d
KURVE 1: 0.29 d



MALTOSE/FG



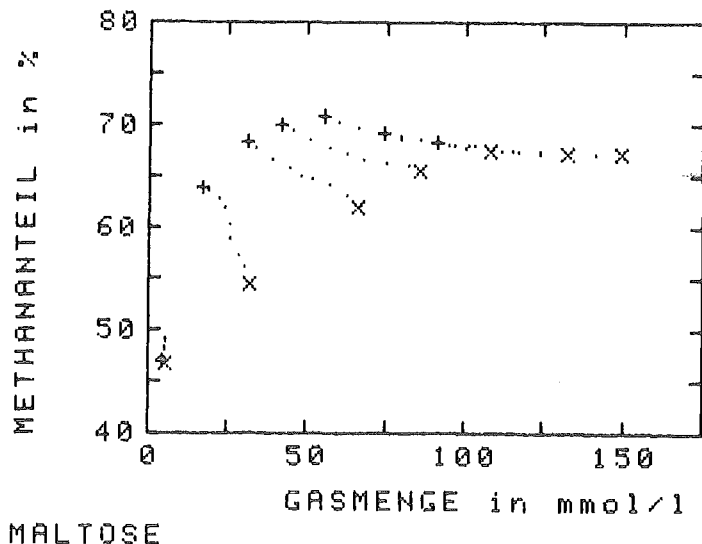
MALTOSE/CH₄

MALTOSE/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Gut abbaubar ohne nennens-
werte Adaptationsphase.

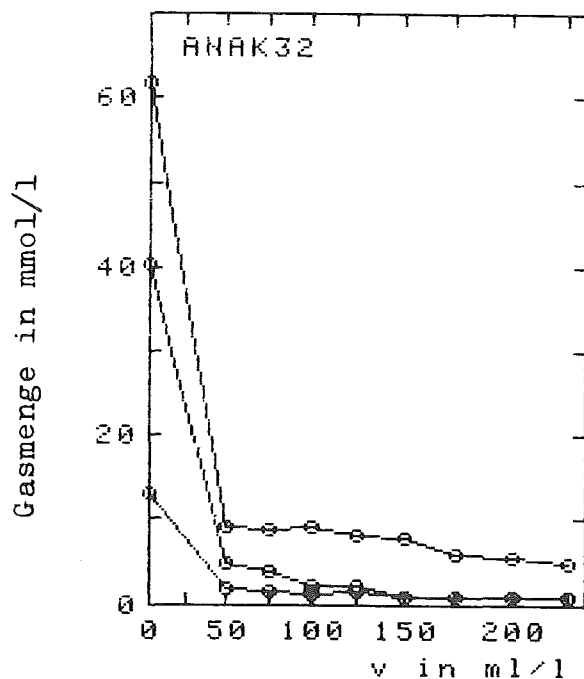


Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

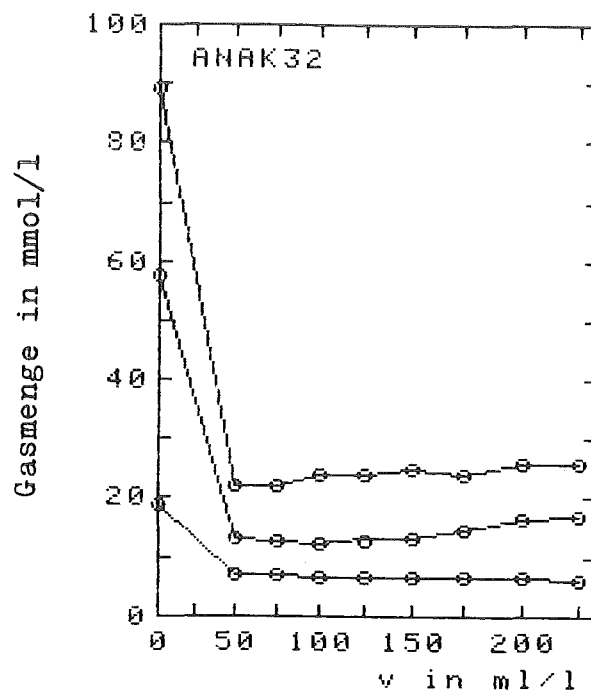
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

MONOCHLORESSIGSAURE

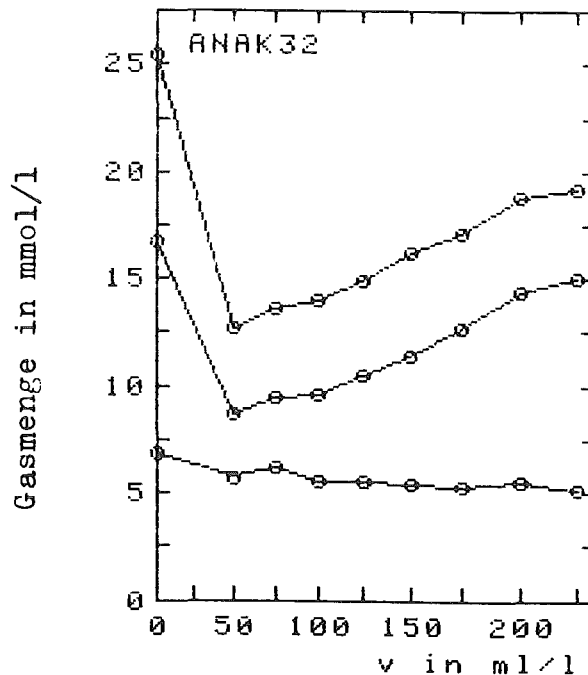
KURVE 3: 30.00 d
KURVE 2: 16.00 d
KURVE 1: 4.00 d



MONOCHLORESSIGSAURE/CH₄



MONOCHLORESSIGSAURE/FG

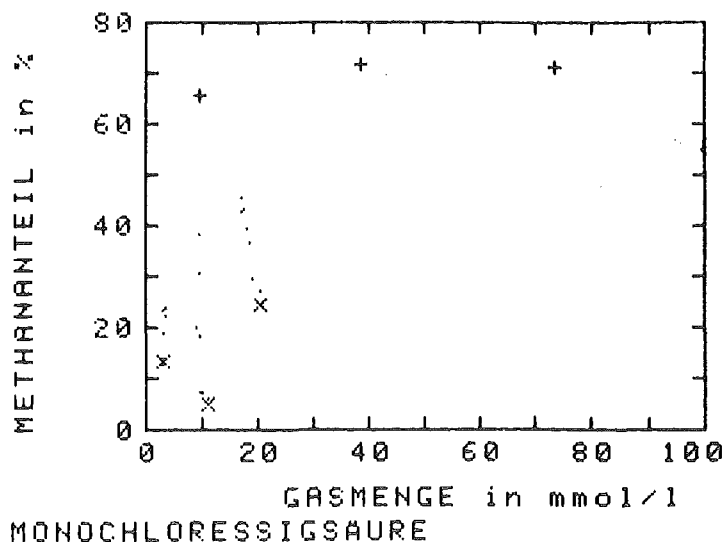


MONOCHLORESSIGSAURE/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Toxisch.

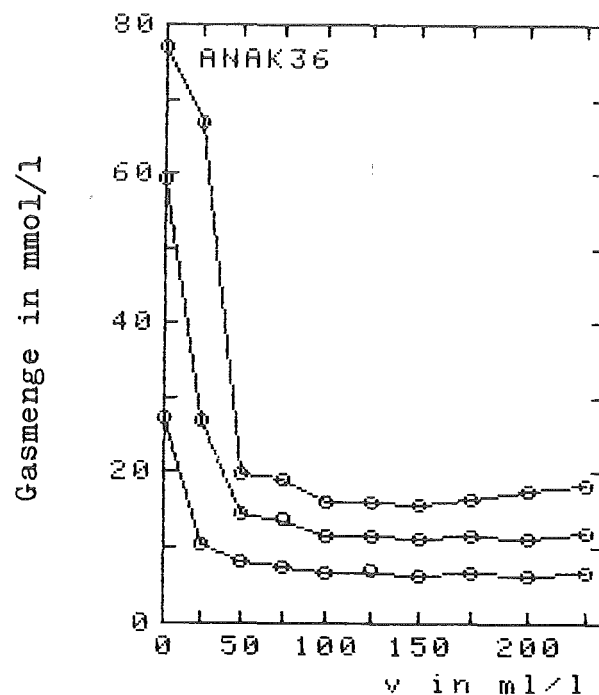


Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

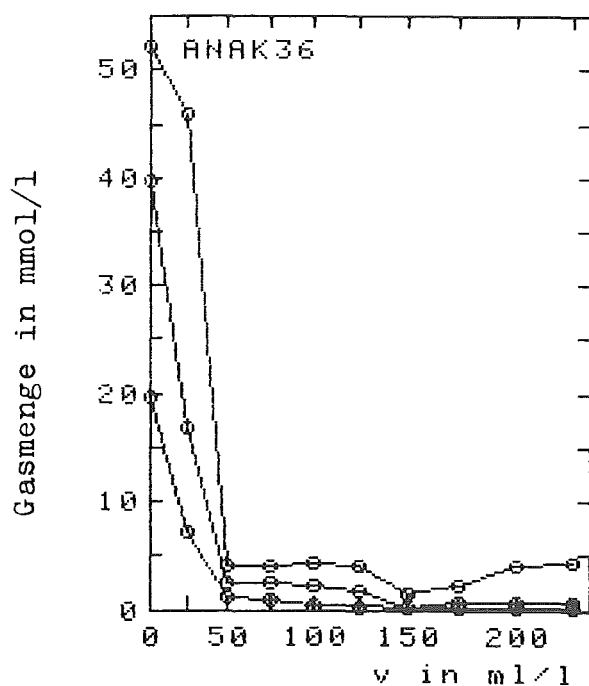
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

MONOCHLORESSIGSAURE

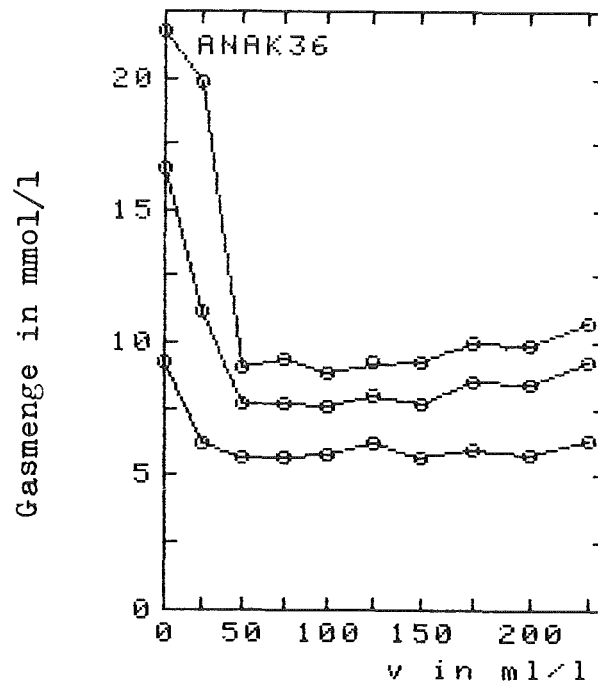
KURVE 3: 34.00 d
KURVE 2: 21.00 d
KURVE 1: 7.00 d



MONOCHLORESSIGSAURE/FG



MONOCHLORESSIGSAURE/CH₄

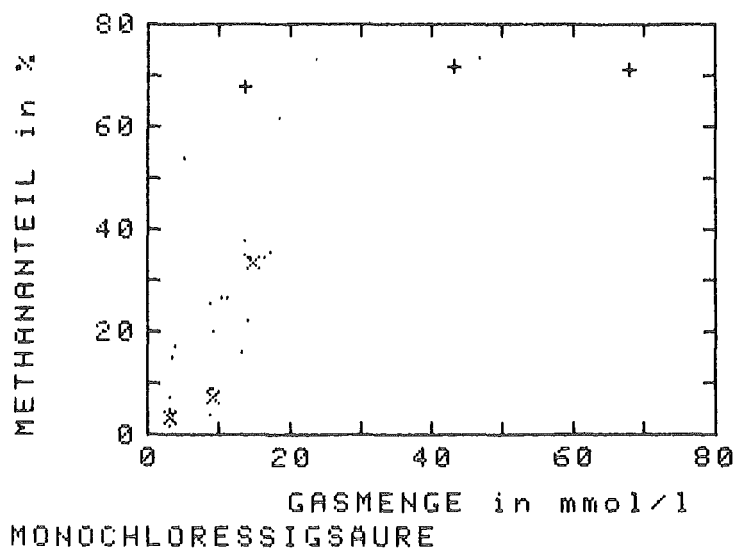


MONOCHLORESSIGSAURE/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Toxisch.

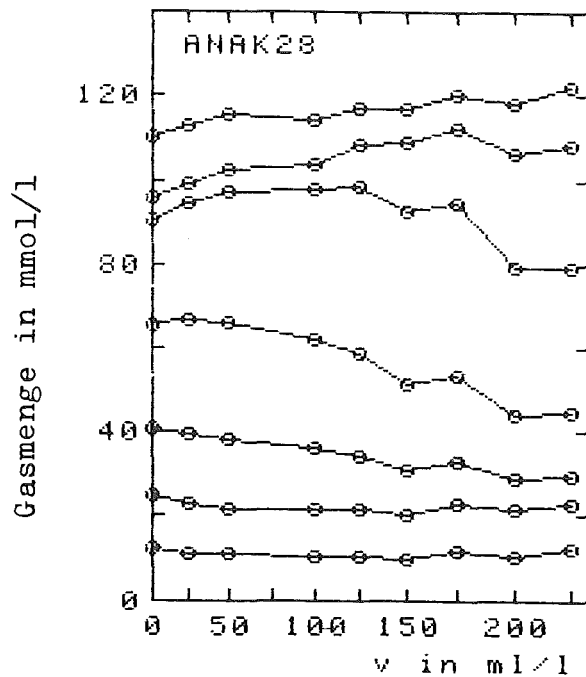
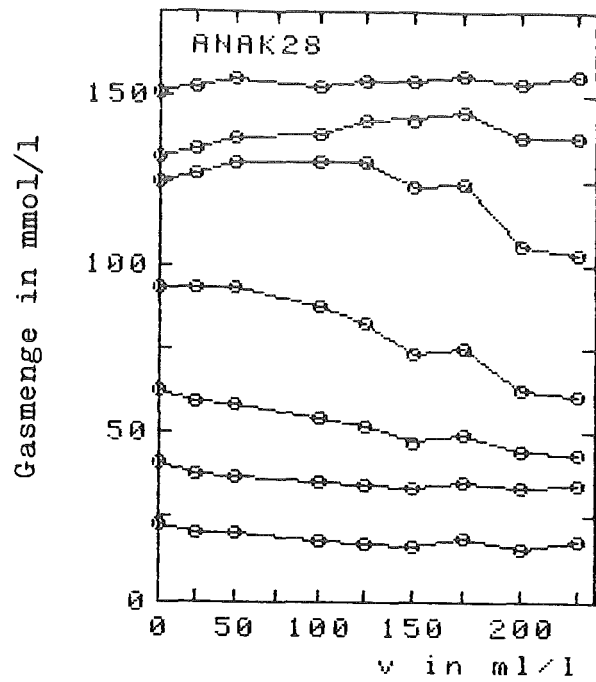


Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

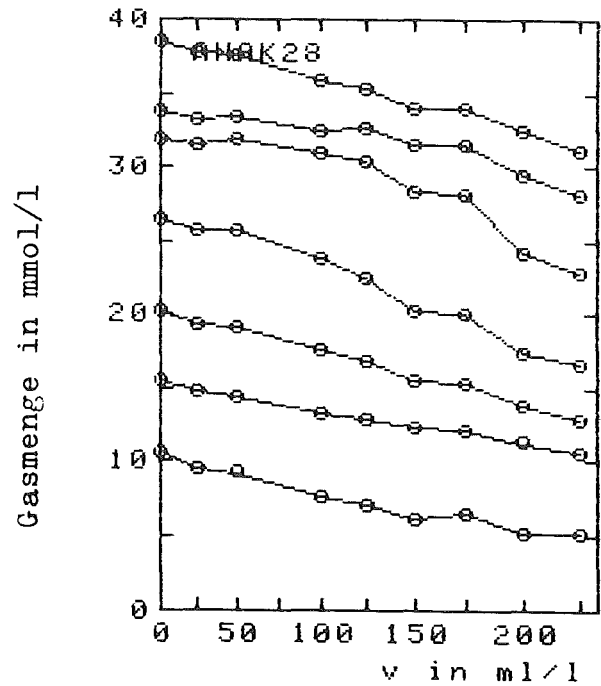
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

OXALSAURE

KURVE 7: 20.00 d
KURVE 6: 15.00 d
KURVE 5: 13.00 d
KURVE 4: 10.00 d
KURVE 3: 8.00 d
KURVE 2: 6.00 d
KURVE 1: 3.00 d

OXALSAURE/CH₄

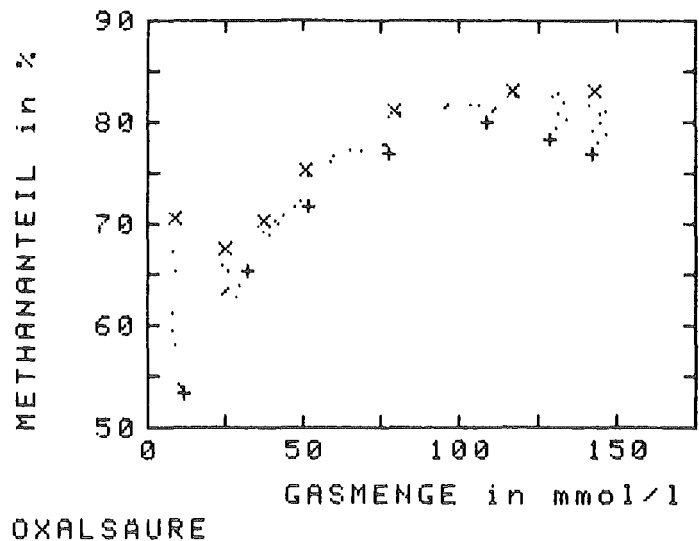
OXALSAURE/FG

OXALSAURE/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Anfangs geringe Hemmung;
zum Ende hin geringer Abbau.



OXALSAURE

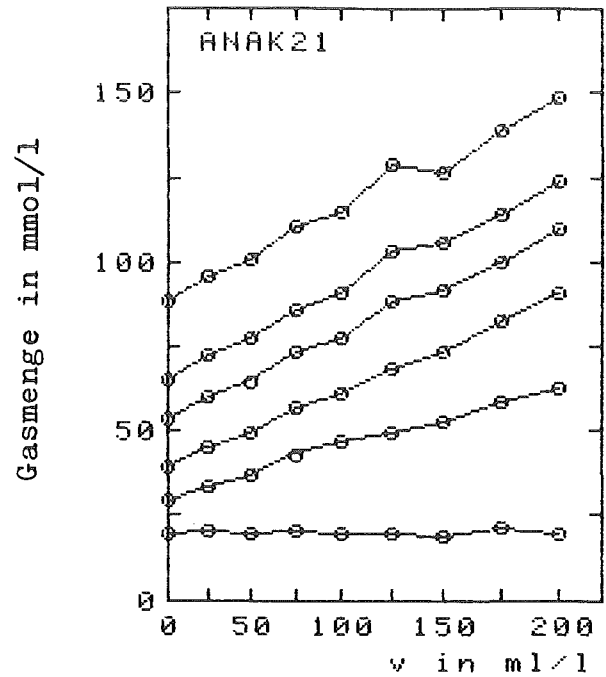
TAFEL 014

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

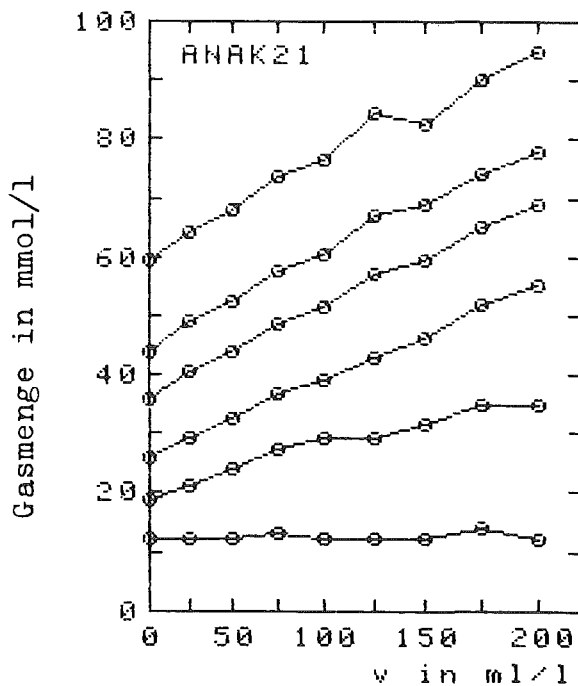
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

PALATINIT

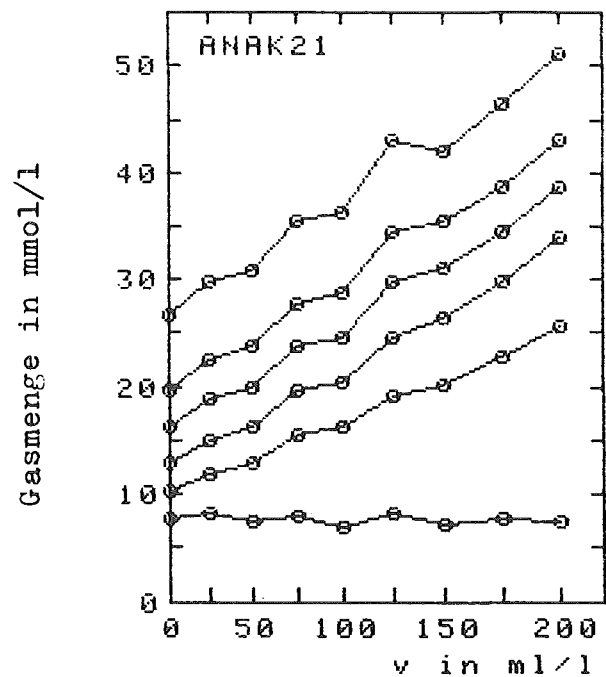
KURVE 6: 22.00 d
KURVE 5: 10.00 d
KURVE 4: 6.00 d
KURVE 3: 3.00 d
KURVE 2: 2.00 d
KURVE 1: 1.00 d



PALATINIT/FG



PALATINIT/CH₄

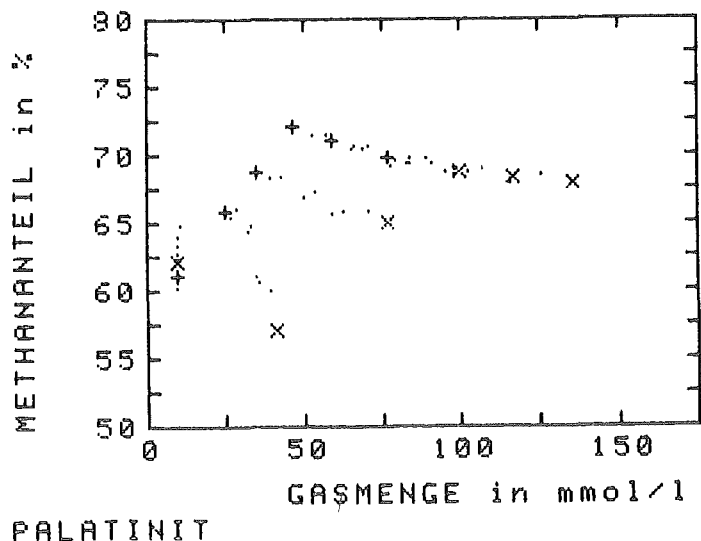


PALATINIT/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Abbaubar nach kurzer
Adaptationsphase.



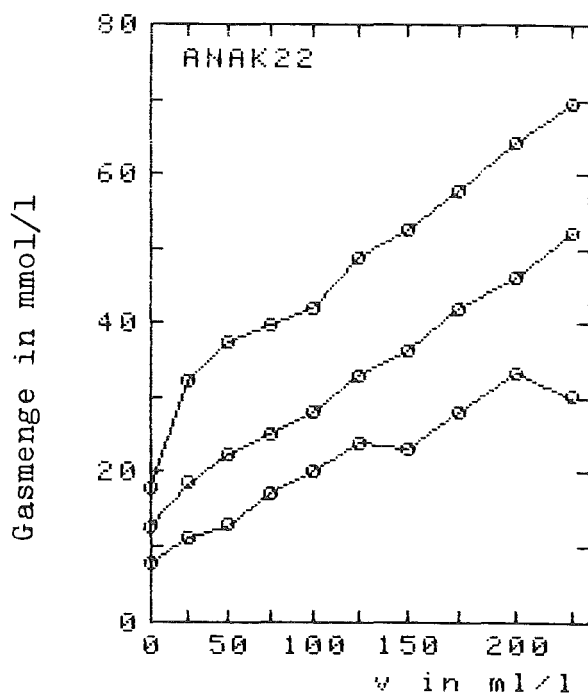
TAFEL 015

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

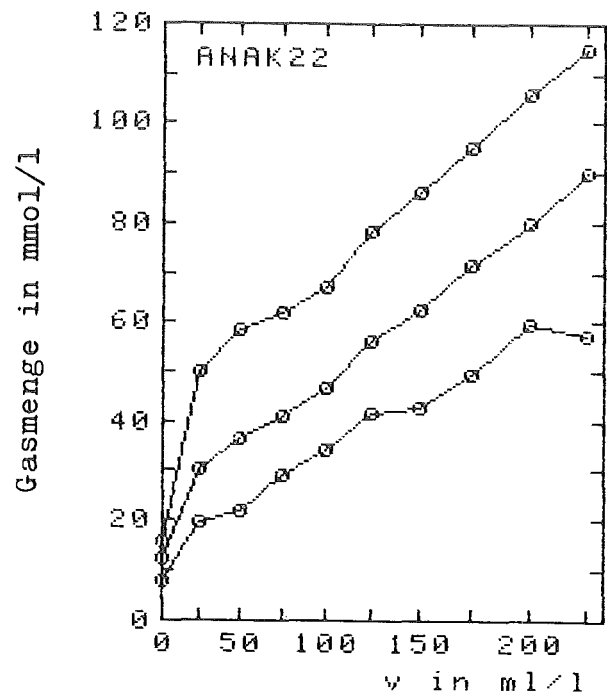
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

PALATINIT

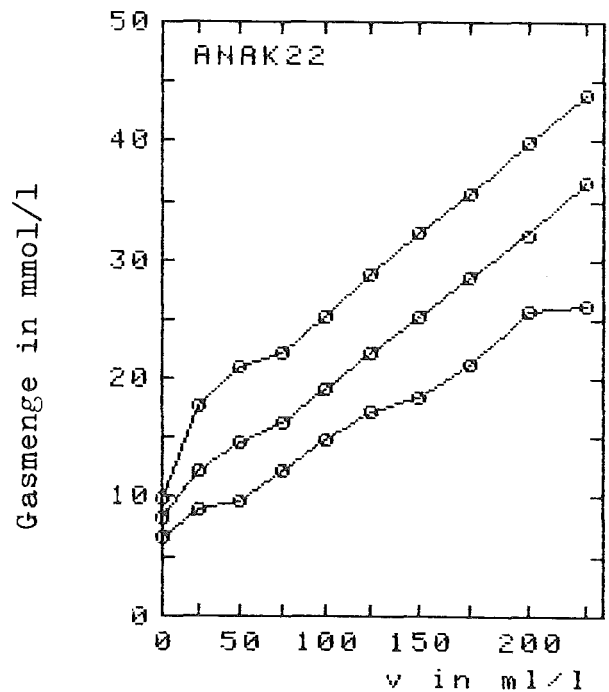
KURVE 3: 19.00 d
KURVE 2: 7.00 d
KURVE 1: 3.00 d



PALATINIT/CH₄



PALATINIT/FG

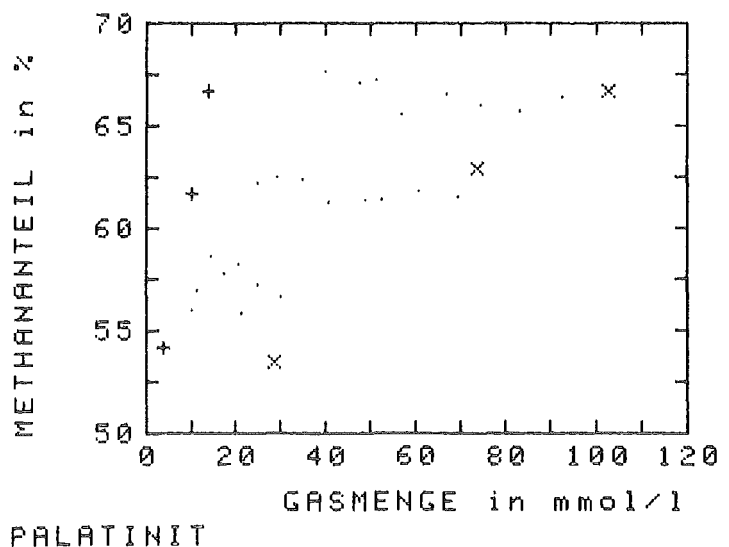


PALATINIT/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Abbaubar nach kurzer
Adaptationsphase.

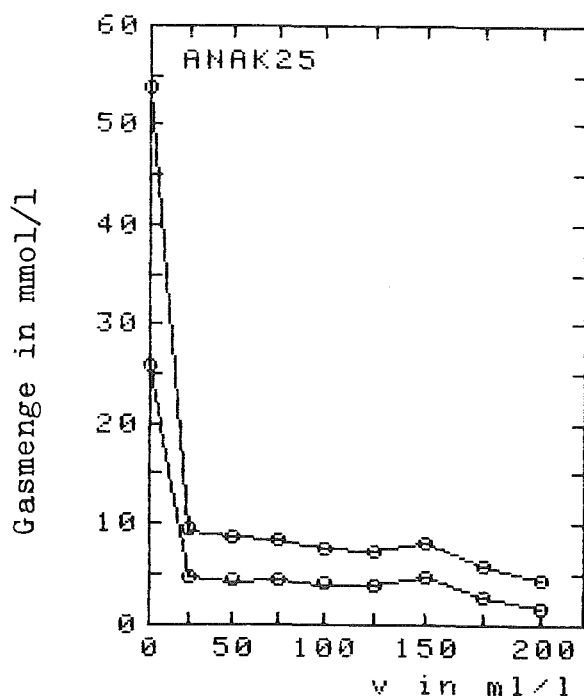


Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

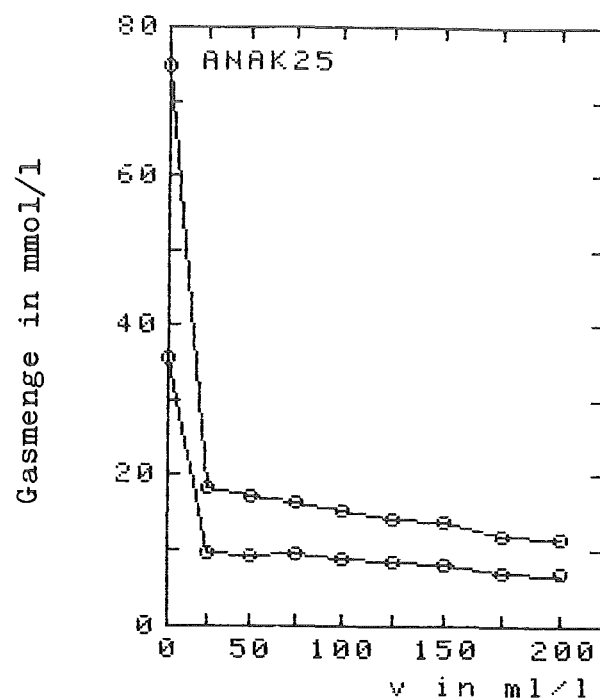
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

PENTACHLORPHENOL

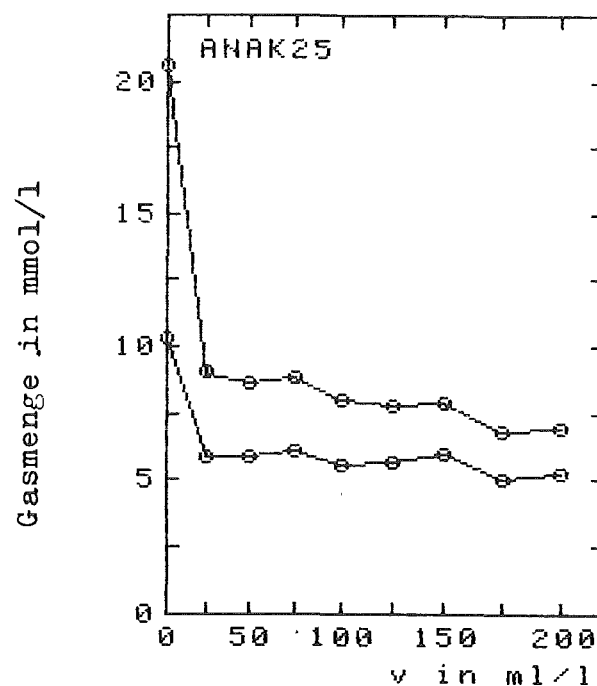
KURVE 2: 35.00 d
KURVE 1: 8.00 d



PENTACHLORPHENOL/CH₄



PENTACHLORPHENOL/FG

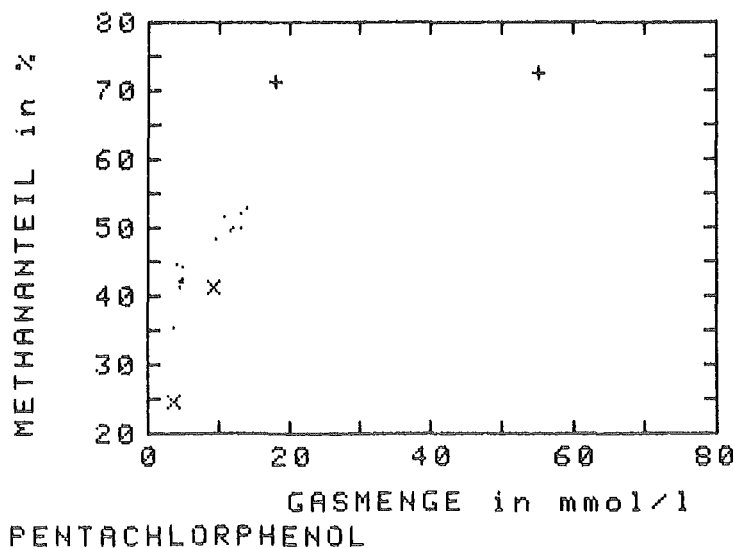


PENTACHLORPHENOL/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Bereits bei einer Konzentration von 50 mg/l toxisch; innerhalb von 35 Tagen keine Erholung.

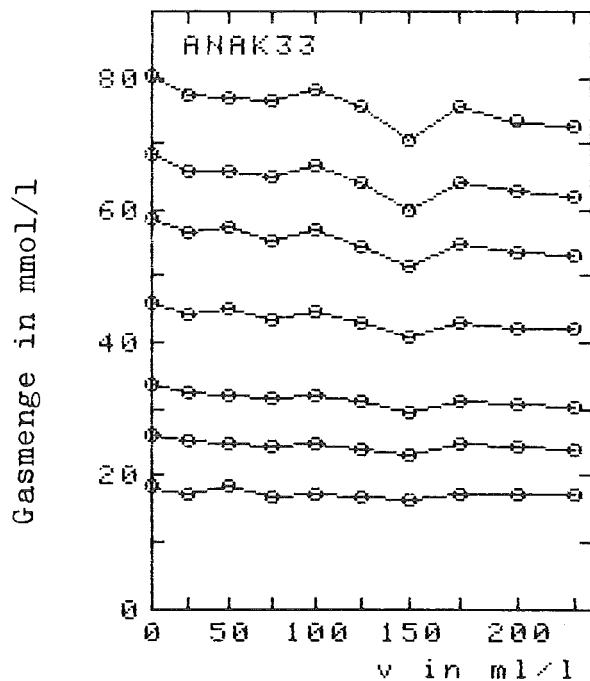
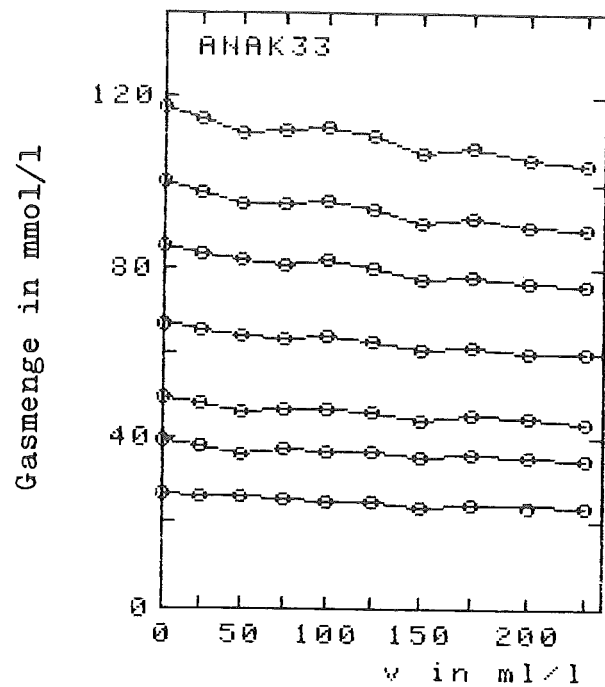


Konzentrationsabhängigkeit der Gasproduktion:

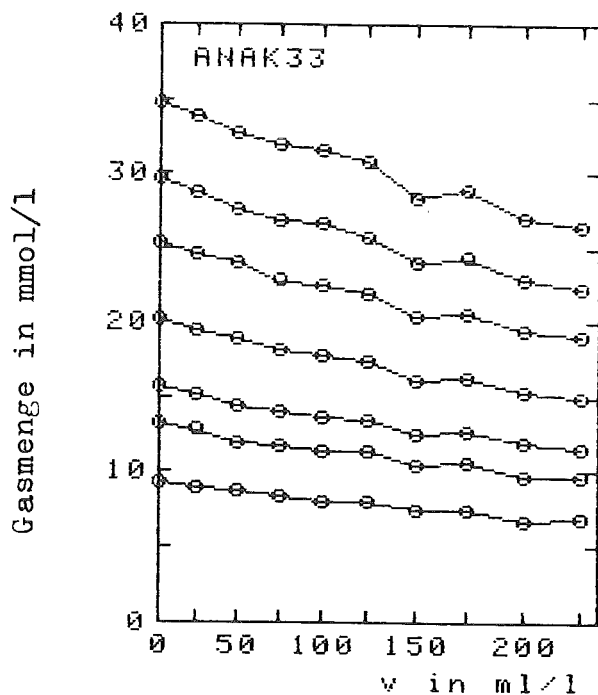
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

PYRIDIN

KURVE 7: 33.00 d
KURVE 6: 24.00 d
KURVE 5: 18.00 d
KURVE 4: 11.75 d
KURVE 3: 7.00 d
KURVE 2: 5.00 d
KURVE 1: 3.00 d

PYRIDIN/CH₄

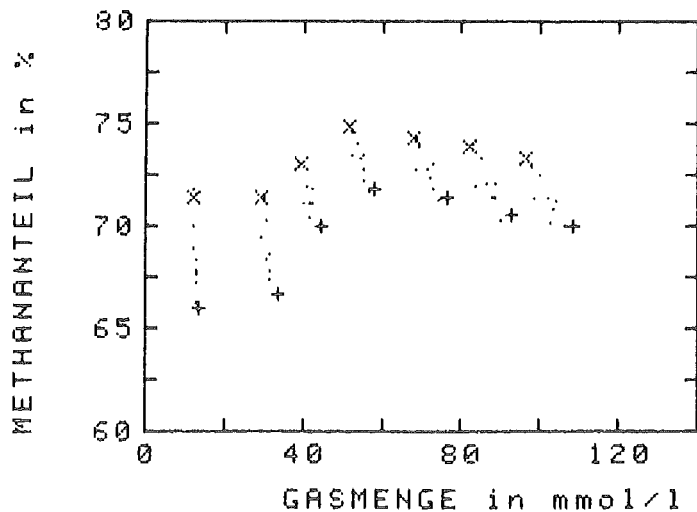
PYRIDIN/FG

PYRIDIN/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Inert bis schwach toxisch
nach der CH₄-Entwicklung;
etwas stärker toxisch nach
der CO₂-Entwicklung.



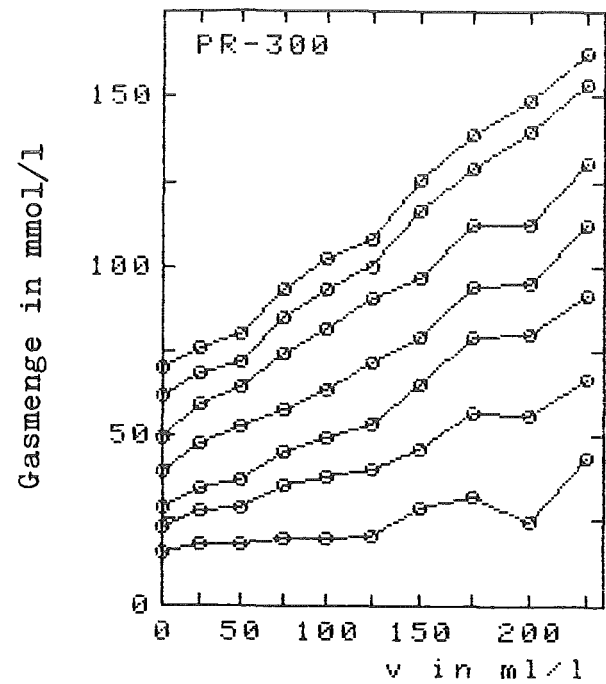
PYRIDIN

Konzentrationsabhängigkeit
der Gasproduktion:

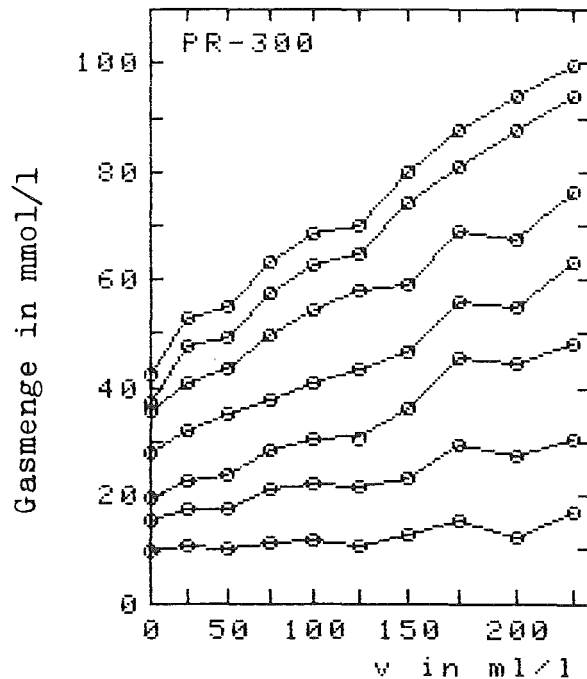
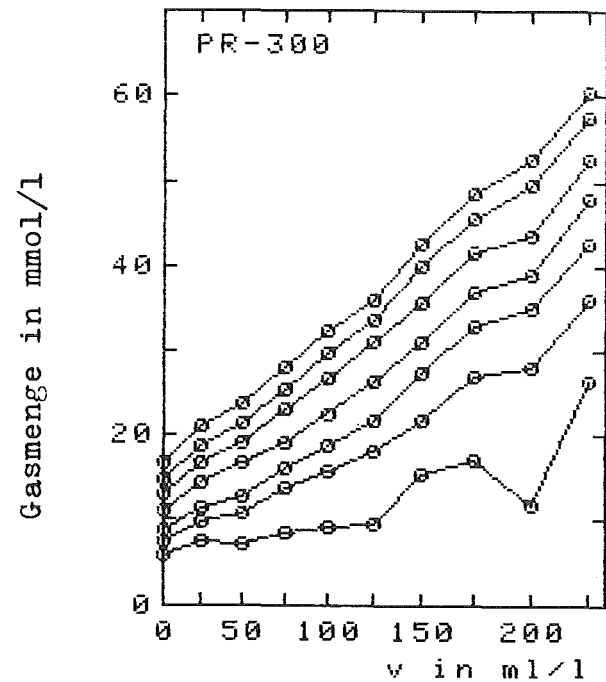
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

SACCHAROSE

KURVE	7:	13.00 d
KURVE	6:	9.75 d
KURVE	5:	7.00 d
KURVE	4:	5.00 d
KURVE	3:	3.00 d
KURVE	2:	1.75 d
KURVE	1:	1.00 d



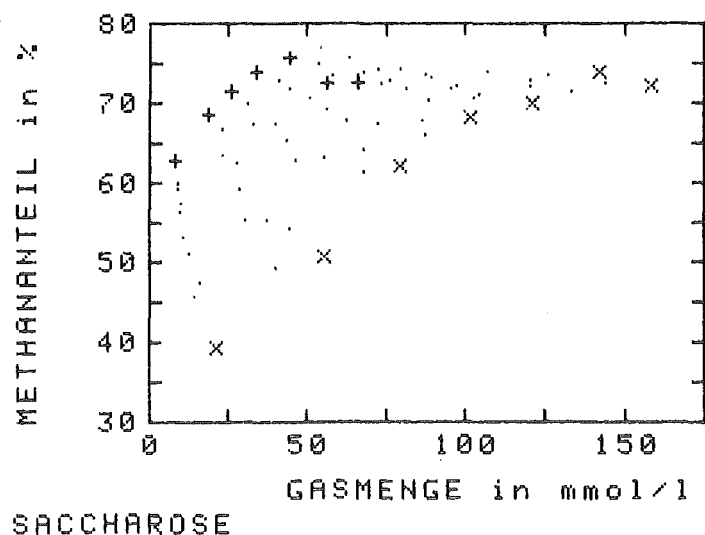
SACCHAROSE/FG

SACCHAROSE/CH₄SACCHAROSE/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Gut abbaubar ohne nennenswerte Adaptationsphase.

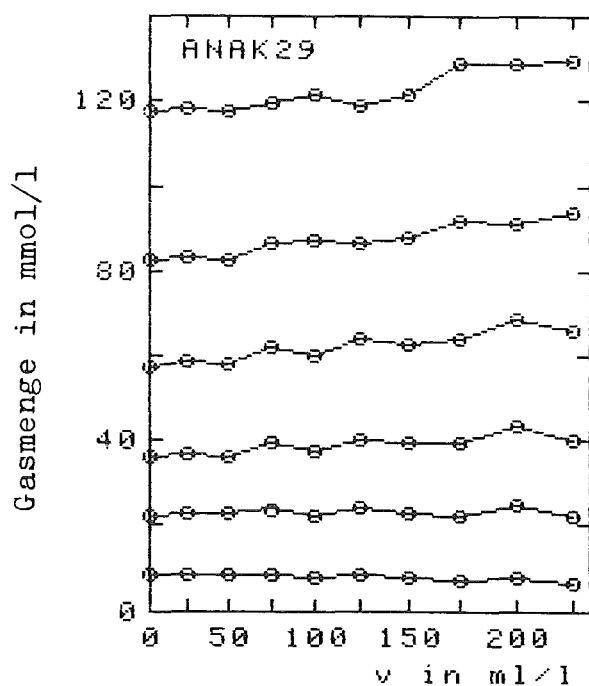
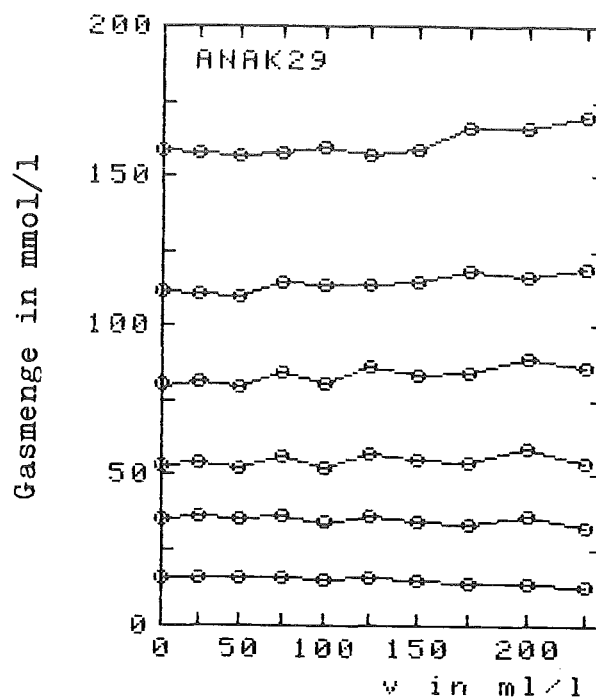


Konzentrationsabhängigkeit der Gasproduktion:

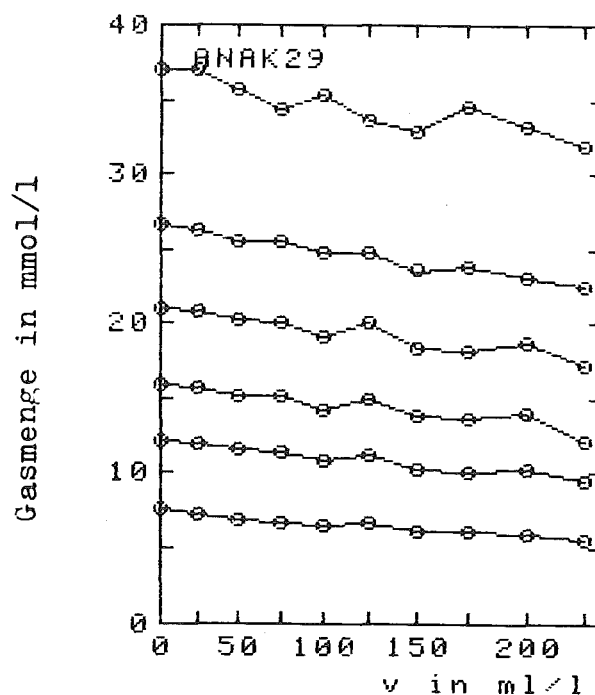
Faulgas - FG
Methan - CH₄
Kohlendioxid - CO₂

SCHLAMM-FHM

KURVE 6: 37.00 d
KURVE 5: 14.00 d
KURVE 4: 11.00 d
KURVE 3: 9.00 d
KURVE 2: 7.00 d
KURVE 1: 3.00 d

SCHLAMM-FHM/CH₄

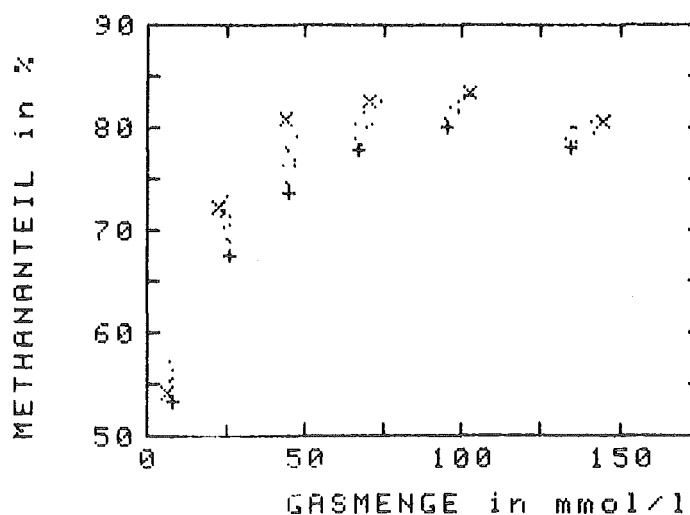
SCHLAMM-FHM/FG

SCHLAMM-FHM/CO₂

Methananteil
im Faulgas

KURZBEURTEILUNG:

Inert bis schwach abbaubar
nach einer Adaptationsphase
von circa 10 Tagen.



SCHLAMM-FHM

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7267)

BIOKALORIMETER ZUR MESSUNG INDIKATORISCHER WERTE
FÜR DEN BESLASTUNGSGRAD VON WÄSSERN

von

Prof.Dr.med. A. Reis, Dr.Ing. N. Kirmaier,
Dr. F. Hartmann

Institut für Biomedizinische Technik
Museumsinsel 1

D-8000 München 22

Institutsleiter:

Prof.Dr.med. A. Reis

April 1983

ZUSAMMENFASSUNG:

Die Zahl der Schadstoffe im Wasser und ihre möglichen Angriffspunkte im tierischen und menschlichen Organismus entziehen sich den derzeitigen Kontrollsystemen. Man benötigt deshalb einen Toxizitätstest, der die Summenwirkung toxischer Stoffe summarisch in einen Screeningtest anzeigen kann. Während sich bekannte Bakterien-Toxizitätsteste ausschließlich polarographischer Sauerstoffmessungen bedienen, wird in dem von REIS beschriebenen, bioenergetischen Toxizitätstest der O₂-Verbrauch und die Wärmeproduktion simultan gemessen. Dadurch soll die Bandbreite der Registrierbarkeit toxischer Belastungen erweitert werden. Dieser bisher vorwiegend an Hefezellen erprobte Toxizitätstest wurde auch unter Einbeziehung weiterer Mikroorganismen, vor allen typischer "Wasserbakterien" anhand ökotoxilogisch relevanter Chemikalien geprüft. Einen wesentlichen Raum nahm auch die Weiterentwicklung eines Geräteprototypen ein. Die Arbeiten sind durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie über die KFA Jülich von 1979 bis 1982 gefördert worden.

SUMMARY:

The influence of toxic and pharmaceutical substances on the energy metabolism of the human cell can be studied with in comparatively wide limits on yeast cells and bacterias. The reason is that the metabolism of those microbes very closely resembles the substrate metabolism in humans cells. The most important criterion for measuring such influence in suspension of yeast and bacterias is the oxygen consumption and the synchronus caloric production which can be determined with the newly developed system here presented. This is a quasi-adiabatic calorimeter system which permits synchronous recording of temperature and partial oxygen pressure in a yeast or bacteria suspension during aerobe as well as during anaerobe oxydation. Two thermostat controlled heating jackets afford practically complete insulation from ambient conditions and ensure an accuracy of 10^{-3} K. The system has been testet on various relecant toxic substances on cooperation with the KFA, Jülich and BMFT-projects of environmetal research since 1979.

Bei der Erzeugung und Verbreitung chemischer Substanzen entsteht insbesondere durch Zufluß dieser Substanzen in Wasser ein nicht unerhebliches Risiko für die Umwelt. Die Zahl der Schadstoffe im Wasser und ihre möglichen Angriffspunkte im menschlichen und tierischen Organismus übersteigt bisher jede Art von Möglichkeiten der derzeitigen Kontrollsysteme. So ist es praktisch nicht möglich, die einzelnen Substanzen zu identifizieren und in ihrer Konzentration zu ermitteln. Diese Aufgabe ist sogar unerheblich und würde umfangreichste wissenschaftliche Untersuchungen bezüglich ihrer Zusammensetzung und Kombinationswirkung auf Organismen voraussetzen. Man bemüht sich deshalb im verstärkten Maße um einen summarischen Toxizitätstest, der die Summenwirkung verschiedener Gifte und verschiedener Giftkonzentrationen summarisch anzeigen kann. Diese Bemühungen haben bereits Eingang in das Abwasserabgabengesetz gefunden in Form eines Fischtestes und eines chemischen bzw. biologischen Sauerstoffbedarfstestes. Der ursprünglich vorgesehene und vielfach diskutierte biologische bzw. bakteriologische Test konnte jedoch nicht eingeführt werden, da die Zuverlässigkeit der vorgeschlagenen verschiedenen Meßverfahren hierzu von den Experten nicht einhellig gebilligt werden konnten. Eine neue Möglichkeit Umweltbelastungen im Wasser messen zu können, ergibt sich mit einem neu entwickelten bioenergetischen Toxizitätstest. Dieser bioenergetische Toxizitätstest verwendet ein quasiadiabatisches Kalorimetersystem für Stoffwechseluntersuchungen an Bakterien und Hefezellen.

Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung einer Substanz ist die Beeinflussung des Energiestoffwechsels von Bakterien und Hefezellen. Insbesondere die Hefezellen besitzen ca. 1.000 Enzyme. Ihr Energiestoffwechsel entspricht dem des Menschen mit guter Nahrung.

Als Indikator einer Beeinflussung des Substratstoffwechsels dient in erster Linie das Sauerstoffkalorienäquivalent, also die während der aeroben Oxidation freigesetzte Wärme in Abhängigkeit vom verbrauchten Sauerstoff. Die exakte Erfassung der bei der aeroben Substratoxidation entstehenden geringen Wärmemengen kann nur mit Hilfe eines empfindlichen Kalorimetersystems erreicht werden. Die Bestimmung des Sauerstoffkalorienäquivalentes macht eine zusätzliche Aufzeichnung des Sauerstoffverbrauchs erforderlich. Der neuartige Test hat im Gegensatz zu den bisherigen Tests die Möglichkeit, sowohl den aeroben als auch den anaeroben Oxidationsanteil der Bakterien oder Hefesuspension zu messen. Gleichzeitig wird dabei die Wärmeproduktion erfaßt. Durch dieses Meßverfahren wird die Messung von speziellen Giften, die im anaeroben Teil der Oxidation angreifen, ermöglicht. Die meisten bisher bekannten Toxizitätsmeßsysteme erlauben nicht diese Möglichkeit, bieten also nur einge-

schränkte Indikationsmöglichkeiten. Von besonderer Wichtigkeit ist ebenfalls die Messung der Wärmeproduktion, die eine weitere wichtige Meßgröße darstellt, da eine Wärmeproduktion bei Bakterien oder Hefezellen in Anwesenheit eines Giftes gegenüber einer Normalfunktion signifikant verändert ist. Unterschiedliche Giftarten wiederum beeinflussen verschiedenartig sowohl den Sauerstoffverbrauch als auch die Wärmeproduktion. Aus der unterschiedlichen Relation beider Meßgrößen lassen sich hierdurch wichtige Rückschlüsse auf verschiedene toxische Substanzen ziehen.

Energiefluß in Hefezellen und Bakterien als Objekt eines Toxizitätstestes

Ein Toxizitätstest (T.T.), der den genannten Anforderungen genügt, besteht danach in einem Testobjekt, das an einer oder mehreren Lebensäußerungen einer Zelle einen meßbaren Grad der Schädigung durch ein Gift nachweist.

Er besteht ferner in einer apparativen Entwicklung, die die biologischen Parameter in eine bestimmte technische Meßgröße umwandelt. Die Testobjekte, die die Fähigkeit besitzen, auf Schadstoffe, die im Wasser enthalten sind, bezüglich des Stoffwechsels vergleichbar zu reagieren wie die menschliche Zelle, sind verschiedene Hefen und Bakterien. Die Verlagerung der Angriffspunkte einer toxischen Substanz vom anatomischen Ort ihrer stofflichen Kontakte auf den biologischen Energiefluß ermöglicht, dem "pathogenetischen Prinzip" von BÜCHNER [4] entsprechend, eine weitgehende Vereinfachung eines T.T.. Die Bioenergetik hat in neuerer Zeit die stoffliche und energetische Grundlage der lebenden Zelle aufgeklärt und gezeigt, daß stoffliche Vorgänge im System der biochemischen Reaktionen adäquat zu ihren energetischen Wirkungen gesetzt werden können. Eine stoffliche Störung im Ablauf der chemischen Reaktionen der biologischen Oxidationen äußert sich immer in Störungen der Energietransformation von einem stofflichen Energieträger auf den anderen, somit auch in dem gesamten Energiefluß der Zelle.

Es ist daher verständlich, daß eine Substanz, welche die stofflichen Reaktionsabläufe in einer Zelle an irgendeiner Stelle angreift, hemmt oder blockiert, sich auch als toxische Substanz auf den Energiefluß auswirkt. Mit der Übertragung toxischer Effekte vom Stoff auf den Energiefluß umgeht ein T.T. die Analyse des chemischen Geschehens im Stoffwechsel, um nur noch an physikalischen Meßgrößen die Existenz eines Giftes und ihre tödliche Dosis zu messen. Die physikalische Meßgröße besteht aus der Summe aller Wärmeabgaben der Teilreaktionen. Erreicht die Energieabgabe den Wert Null, dann ist der Tod der Zelle eingetreten. Der energetische T.T. an Hefen und Bakterien ist

demnach, wie Untersuchungen bestätigt haben, auch ein Test für den Nachweis der Vergiftungen des Menschen durch toxische Substanzen aus der Umwelt. Wärmemengen, die in Teilreaktionen während des Stoffwechsels als Entropie freiwerden, können aus stofflichen Meßgrößen bestimmt werden. Die Bestimmung des Gesamtenergieflusses während der Zellatmung ist, an der Hefe vorgenommen, relativ einfach. Sie bedarf eines empfindlichen Kalorimeters mit Wärmemengenregistrierung. Die Wärmekurve, bestehend aus einem aeroben und anaeroben Anteil, zeigt den toxischen Angriff auf die Zellatmung an und erlaubt die Berechnung des Toxizitätsgrades.

Der Wärmefluß ist ein Meßparameter, um Schadstoffe im Wasser quantitativ nachzuweisen. Handelt es sich jedoch um Gifte, die nur schwach die Oxidation bei der Zellatmung hemmen, ist die Hefezelle befähigt, den Rückgang der oxidativen Wärmebildung auf ein Fließgleichgewicht zu regeln, das die Anwesenheit eines Giftes verschleiert; d.h., der Effekt ist dann nicht an der Wärmekurve bei Messung durch ein Kalorimeter wahrnehmbar. In einem solchen Fall bietet die Bestimmung des Energietransformationsgrades im Sinne eines Nutzeffektes der biologischen Oxidation der Zelle eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des T.T. für geringgradige Giftwirkungen. Die Bestimmung des Energietransformationsgrades der Zelle besteht in dem Vergleich der Menge des veratmeten physikalisch gelösten Sauerstoffes der Zellsuspension mit der von ihr abgegebenen Wärmemenge. Wie später näher ausgeführt wird, zeigt sich, daß die zugeführte Substratenergie, gewonnen z.B. aus Zucker- oder Sauerstoffumsatz, immer größer ist, als die von den Zellen abgegebene Reaktionswärme [5]. Die ungestörte biologische Oxidationsreaktion der Zellen investiert, wie auch die Humanzelle, einen Teil der Substratenergie in chemischer Energie, die als Adenosintriphosphat (ATP) in der Zelle gespeichert wird. Je besser, d.h. je gesünder die Zellatmung ist, um so mehr wird Substratenergie in ATP-Energie überführt. Dafür ist die abgegebene Wärme in Form von Entropie geringer. Als Formel ausgedrückt [6]:

Der Quotient der Energietransformation = $\frac{\text{abgegebene Reaktionsenergie}}{\text{errechnete Substratenergie}}$

Dieser Wirkungsgrad verlangt die synchrone Registrierung des O₂- oder Substratumsatzes der Hefe und ihrer Wärmeabgabe. Ein Zellatmungsgift schon geringeren Giftigkeitsgrades, ist am Energietransformationsgrad kontinuierlich nachweisbar.

Stoffwechsel als Objekt eines Toxizitätstestes

Wird die Messung des Energieflusses durch die Stoffwechseluntersuchung der Zelle ergänzt, dann erfährt der kalorimetrische T.T. eine Steigerung seiner Aussagekraft. Es wird dadurch ermöglicht, die Wirkung eines Giftes auf die Hefeatmung mit der Wirkung eines Giftes auf die Atmung der Humanzelle zu vergleichen. Es ist zu erwarten, daß dadurch für manche Gifte das morphologische Korrelat der Energieflußstörung erkennbar wird. Die Teilschritte des Stoffwechsels der Zellatmung sind durch die moderne Biochemie weitgehend aufgeklärt worden [7,8,9,10]. Es kann deshalb hier auf die Beschreibung der Glykolyse, der Gärung, der Vorgänge im Tricarbonsäurezyklus und der Atmungskettenphosphorylierung verzichtet werden.

Die enzymatische Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff kann durch verschiedene Gifte gehemmt werden. Cyanid, eins der schwersten Gifte, hemmt z.B. nur eine Reaktion in der Atmungskette und legt damit die gesamten Oxidationsprozesse still. Das Cyanid ist ein Modellfall für Hefegifte, die in gleicher Weise an irgendeinem Reaktionspartner der Atmungskette den Elektronentransport hemmen oder zum Stillstand bringen. Solche Inhibitoren des Elektronentransports zeigt Tabelle 1.

Agens	Angriffspunkt
CO-Gas	Warburgsches Atmungsferment
Blausäure (CN ⁻)	Warburgsches Atmungsferment
Narkotika (Urethan usw.)	?
Carcinogene Kohlenwasserstoffe	?
Röntgenstrahlen	?
Arsenige Säuren	?
Schwefelwasserstoff	?

Tabelle 1: Inhibitoren des Elektronentransports [11].

Es hat sich gezeigt, daß beim Übergang der Elektronen auf den Sauerstoff die Elektronen bereits ihre Energie für die Bildung von ATP in Teilreaktionen abgegeben haben.

Wie das Beispiel des Cyanids gezeigt hat, ist es möglich, mit Giften die Atmung zu hemmen, bekannt unter dem Namen Atmungsgifte. Außer der Schädigung an der Atmungskette durch Atmungsgift gibt es aber eine Gruppe von Giften, die den Übergang der Elektronenenergie in ATP hemmen oder blockieren, d.h. sie schädigen die Phosphorylierung, ohne den Elektronenfluß zu hemmen [4]. Als Entkopplungsgifte bekannt, greifen sie zwischen den Pyridinfermenten und dem Cytochrom C in die Atmungskettenphosphorylierung ein (Abbildung 1 und Tabelle 2).

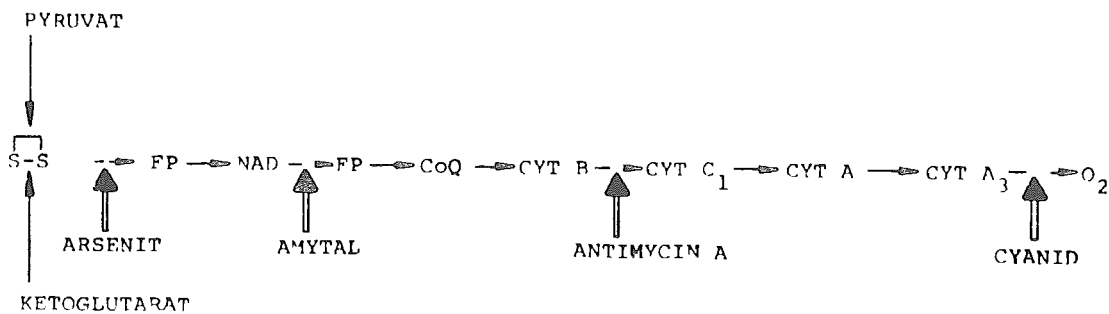


Abbildung 1: Angriffspunkte von Giften in der Atmungskettenphosphorylierung [nach 13].

<p>Mechanisch: Ultraschall, Sand, Fremdkörper</p>
<p>Physikalisch: Einfrieren (-3°), Erhitzen (+45°), faraday'sche Reizung, ultraviolettes Licht, Röntgenstrahlen, radioaktive Strahlen, hyper- und hypotone Lösungen</p>
<p>Chemisch: Schwefelwasserstoff, Thioharnstoff, Thioacetamid, Arsenit, Jodaacetamid, p-Chlormercuribenzoat Phenosafranin, Methyleneblau, Thionin, Janusgrün (Vitalfärbung der Mitochondrien), p-Phenyldiamin, Brillantkresylblau Barbiturate, Atebrin, Dicumarol und Vitamin K-Antagonisten, Salicylsäure, Aureomycin, Gramicidin Dinitrophenol, Dibromphenol, Trijodphenol, N-4-Oxy-3, 5-Dijodbenzoesäurebutylester, Trijodthyronin, Thyroxin Gallensäuren, Ätzmittel Bezin, Tetrachlorkohlenstoff Calcium</p>

Tabelle 2: Inhibitoren der Atmungsphosphorylierung [11].

Bei dem Vorgang der Entkoppelung läuft der Sauerstoffverbrauch weiter, die Elektronenergie entzieht sich der ATP-Synthese.

Anorganisches Phosphat und Adenosindiphosphat (ADP) bleiben trotz des hohen Sauerstoffverbrauchs ungenützt und stehen der Glykolyse zur Verfügung. In diesem Falle bestehen Glykolyse und Atmung nebeneinander. Dieser Vorgang ist seit WARBUNG unter der Bezeichnung "aerobe Glykolyse" bekannt [11]. Die energetische Bilanz der Atmungskettenphosphorylierung wird durch das P:O-Verhältnis [ZÖLLNER, 11] angegeben (Tabelle 3).

Ansatz: Gewaschene Nierenhomogenat-Partikelchen + Hexokinase + Fructose + Glutaminat
+ Adenylsäure + MG + PO

	O ₂ -Aufnahme Mikroatome	P-Aufnahme Mikroatome	Quotient P:O
ohne Dinitrophenol	8,0	17,5	2,2
mit Dinitrophenol ($1,8 \cdot 10^{-4}m$)	7,9	1,3	0,2

Tabelle 3: Hemmung der Kopplung zwischen Oxidation und Phosphorylierung durch Dinitrophenol
(W.F. Loomis und F. Lipmann)

Besteht ein toxischer Einfluß auf die Atmungskettenphosphorylierung, so ist der P:O-Quotient vermindert. Ein klassisches Gift, das die Atmungskettenphosphorylierung hemmt, d.h. den P:O-Quotienten verändert, ist das Hormon der Schilddrüse, das Thyroxin [11]. Im Hinblick auf der Suche nach geeigneter Stoffwechselreaktion zum Nachweis eines Giftes ist der P:O-Quotient von besonderem Interesse. Leider aber ist die Bestimmung des ATP noch zu schwierig. Wie ausgeführt, sind die einzelnen Etappen im Energiestoffwechsel beeinflussbar, die je nach chemischer Konstitution eine Beschleunigung oder Verlangsamung der biochemischen Reaktion auslösen.

Sie lassen sich einteilen in:

1. Glykolysegifte
2. elektronentransporthemmende Gifte
3. tricarbonsäurezyklushemmende Gifte
4. Phosphorylierungsentkoppler, die den Elektronentransport nicht wesentlich treffen

Die Darstellung des Energieflusses und Stoffwechsels in der biologischen Lebensinheit, der Zelle, hat gezeigt, daß es möglich ist, die Wirkung von Giften messend zu beobachten. Als gesicherte Meßverfahren für einen Toxizitätstest bieten sich an:

1. Der Quotient der $\frac{\text{abgegebene Reaktionsenergie}}{\text{errechnete Substratenergie}}$ Energietransformation
2. Der Quotient von $\frac{\text{Milchsäure}}{\text{Brenztraubensäure}}$
3. Der P:O-Quotient**
4. Der Quotient von $\frac{\text{aerober Wärmeabgabe}}{\text{anaerober Wärmeabgabe}}$
5. Elektronendichte

Weitere Kriterien für einen Toxizitätstest

Für den Nachweis von Giften, die über die Hemmung der Biokatalysatoren der Zellatmung wirksam sind, gibt es noch andere Kriterien im Stoffwechsel der Hefezelle. Dazu gehören die spezifischen Zelleistungen wie z.B. die Zuckervergärung, bei welcher der Umsatz von Zucker in Alkohol und CO_2 als quantitatives Maß für den Grad der Schädigung durch Gifteinwirkung dienen kann [12]. Im Falle von selektiven Abgrenzungen von Giften ist die Bestimmung der Gärungsleistung ein zuverlässiges Verfahren.

Die Giftwirkung von etwa 500 Substanzen ist eingehend untersucht worden (Zellteilung und Zellwachstum an *Saccaromyces cerevisiae* und Colibakterien (siehe Tabelle 4).

Abbildung 2 zeigt das Hefewachstum bei Bestrahlung mit UV-Licht als Noxe [12].

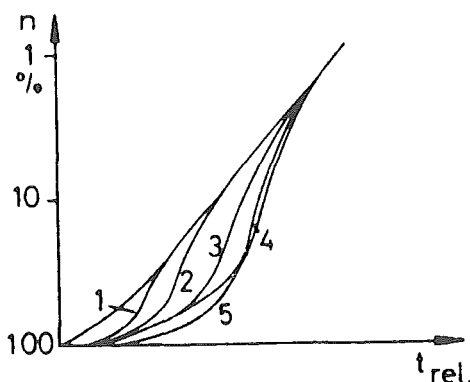


Abbildung 2: Dosis-Effektkurven mit Schablonenraster D/D_{99} , für *Saccaromyces cerevisiae* (dipl.) in verschiedenen Altersstufen 1, 2, 3, 4, 5 mit UV-Licht als Noxe (nach F. Weinfurtnner und Voerkelius [12]).

Auch die Wachstumsrate ist ein spezifischer Kontrolltest für eine Schädigung durch toxische Substanzen; allerdings ist es ein Verfahren, das mit einem Schnelltest wie der O_2 -Umsatzänderung nicht konkurrieren kann. Letzterer zeigt die Einwirkung von Giften, der Wachstumstest dagegen erst in Minuten bis Stunden eine Änderung der Wachstumsrate an [19]. Mit Hilfe einer Vorinkubation sind selbst die Wirkungen langdauernder enzymatischer Prozesse mit Hilfe des Schnelltestes erfassbar.

Die Bestimmungen des Dosis letalis ist in bestimmten Fällen von hochgiftigen Substanzen von besonderer Bedeutung. Bei einem Toxizitätstest solcher Art sind Hefen und Bakterien ebenfalls als Testobjekt geeignet; es empfiehlt sich

gleichzeitig mehrere Giftreaktionen zu bestimmen, um mit größerer Sicherheit den Zeitpunkt des Todes der Zelle bestimmen zu können.

Substanzen	In standardisierter synthetischer Nährlösung			In Saccharose-Agar	In Melasse-Agar	Reihenfolge der Giftigkeit verschiedener Substanzen in verschiedenen Substraten			
	50%ige Hemmung d. Wachstums p.p.m.	100%ige Hemmung d. Wachstums p.p.m.	Grad der Hem- bez. auf Cadmium ***	100%ige Hem- mung d. Wachstums p.p.m.	100%ige Hem- mung d. Wachstums p.p.m.	in synthet. Nährlösung		in Saccharose und Melasse-Agar 100%	in Wasser 100% Hem- mung
						50 % Hemm- mung	100 % Hemm- mung		
Cadmium	0,125	<1,0	10 000	350	500	1	4	6	6
Kupfer	0,175	1,0	7 100	400	<500	2	1	7	5
Silber	0,22	0,4	5 700						
Osmium	0,72	1,0	1 730						
Chlor	1,50	2,0	830	125	200	4	3	4	1
Quecksilber (HgCl ₂)	1,55	1,8	810	40	50	3	2	3	4
Palladium	2,7	10	460						
DDAB ⁺	14	26	39	22	15 – 20	5	5	1	2
CTAB ⁺⁺	21	45	50	25	15 – 20	6	6	2	3
Kobalt	55	115	22,8						
Formaldehyd	60	105	20,8	225	225	7	7	5	10
Lithium	63	125	19,8						
Bor	66	200	19,0						
Nickel	83	185	15,0						
Fluor	90	160	13,9						
Vanadium	93	200	13,4						
Schwefeldioxyd	135	275	9,3	1500	1250	8	8	8	7
Chrom	142	250	8,8						
Arsen	157	230	8,0						
Beryllium	240	350	5,2						
Zinn	285	<350	4,4						
Selen									
Thallium	ca. 400	500 – 600							
Pb, Fe, Zn, Al									
W, Mo, Mn, Cl	<500	<2,5							
Br, J (als X-Salze)									
Phenol	650	1250	1,9	2500	2500	9	9	10	9
Sb, Sr, Ba, U	ungiftig								
Th, La, Rb, Ca, Ti	bei 500								
C, Zr									
Lysol	1450	2000	0,9	1700	2000	10	10	9	8
Mg, X, Na, Ca									
S (als Sulfat)	ungiftig								
P (als Phosphat)									

+ = Decyldimethylammoniumbromid

++ = Cetyltrimethylammoniumbromid

+++ = 0,125 · 10 000, worin x = Konzentration in p.p.m., die von einer Substanz erforderlich ist, um eine 50%ige Hemmung des Wachstums hervorzurufen.

Tabelle 4: Giftigkeit verschiedener chemischer Substanzen, insbesondere von Metallen, in verschiedenen Substraten gegenüber Bäckerhefe (nach [12], Konzentrationsangaben in ppm)

Die Kausalkette der Krankheitsbildung durch Zellgifte ist in Tabelle 5 dargestellt [4, 15, 16].

Zellgifte	Weißer Phosphor, Arsen, Blausäure, Schwefelwasserstoff, Schwefelkohlenstoff, Ammoniak, Kalziumzitrat, Natronsäure, Kohlenmonoxyd, physikal. Agenzien, Dinitrophenol, Thyroxin, Acetessigsäure u.v.a.m.
Angriffspunkte der Gifte	Mitochondrien, Abtransport von Reaktionsprodukten, Sauerstoff- und Substrattransport, Glykose, Zitronensäurezyklus, Atmungskette, Atmungskettenphosphorylierung.
Wirkung der Gifte auf die Zellatmung	Hemmung der biologischen Oxidationen mit konsekutivem Energiemangel, Auslösung des pathogenetischen Prinzips nach F. Büchner [4].
Schädigungsmuster durch Hemmung der Atmung bzw. der Oxidationen	Mitochondrienschwellung, Zerfall der Cristae Mitochondriales diffuses Zellödem, Nekrose.
Krankheitsfolgen des oxidativen Energiemangels	Insuffizienz von Herz-, Gehirn-, Nerven-, Nieren- und Lebergewebe, haemolytischer Ikterus, Erbschäden, Hungerschäden und Kachexie.

Tabelle 5: Kausalkette der Krankheitsbildung durch Zellgifte

Meßtechnik für die Bestimmung der Sauerstoffatmung

Das Prinzip der elektrochemischen Sauerstoffmessung beruht auf der Tatsache, daß die Stromdichte geeignet zusammengestellter galvanischer Elemente unter bestimmten Versuchsbedingungen als exaktes Maß für den im Elektrolyten gelösten Sauerstoff verwendet werden kann. Auf diesem Prinzip beruhen die Sauerstoff-Meßmethoden von TOEDT [17] und von CLARK [15]. Beide Methoden wurden alternativ angewendet.

Meßtechnik für die Bestimmung der Wärmeproduktion

Die von Hefen abgegebenen Wärmemengen pro Gewichtseinheit sind sehr gering. Zu ihrer Bestimmung sind deshalb hoch empfindliche Kalorimeter mit geringen Totzeiten erforderlich. Es wurden verschiedene kalorimetrische Verfahren verwendet.

Systembeschreibung - Gradientenkalorimeter

Das im folgenden näher beschriebene quasiadiabatische Kalorimetersystem wurde ausschließlich für Stoffwechseluntersuchungen an Hefen und Bakterien entwickelt. Daraus ergaben sich spezielle Forderungen bezüglich Aufbau und Leistung.

Um eine Variation bei der Wahl der Testzellen zu ermöglichen, muß der Arbeitsbereich des Kalorimeters den Bereich der Kardinaltemperatur der verschiedenen Testzellen überstreichen. Das Gerät wurde daher für 25 bis 40° C ausgelegt. Die bei der aeroben Oxidation entstehende Wärmemenge ist abhängig von der

Menge des in der Zellsuspension physikalisch gelösten Sauerstoffs und liegt bei 16 bis 18 J/ml O₂ [23]. Die Dauer der aeroben Zellatmung bis zum völligen Verbrauch des Sauerstoffs beträgt bei 10⁹ Keimen je ml ungefähr 4 bis 5 min, der Temperaturanstieg der Suspension $2,5 \cdot 10^{-2}$ K. Daraus ist ersichtlich, daß Regelgenauigkeit und Temperaturlösung sehr hoch sein müssen, auf eine extreme Langzeitstabilität jedoch verzichtet werden kann.

Physiologische Oxidation

Abbildung 3 zeigt die synchrone Darstellung des physiologischen Sauerstoffumsatzes und der Wärmeproduktion einer Hefesuspension. In der Vorbereitungsphase A wird die Hefe zugesetzt (Beginn der Phase B). Der vorhandene physikalisch gelöste Sauerstoff wird veratmet. Gleichzeitig entsteht durch die aerobe Oxidation Wärme. Sobald der physikalisch gelöste Sauerstoff verbraucht ist, fällt die Wärmeproduktion durch die aerobe Oxidation aus; entsprechend nimmt die Gesamtwärmeproduktion ab. Es verbleibt die Wärmeproduktion durch die anaerobe Oxidation (Phase C).

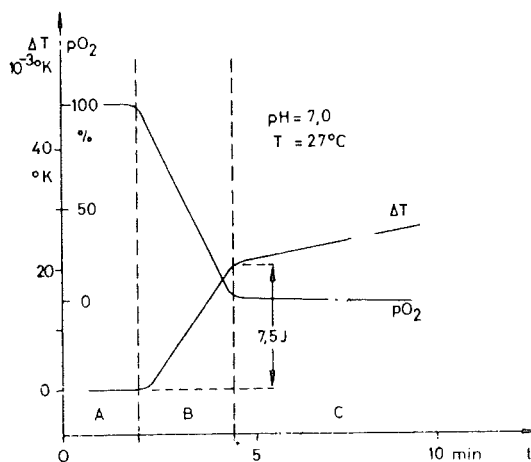


Abbildung 3: Sauerstoffumsatz und Wärmeproduktion einer Hefesuspension in Abhängigkeit von der Zeit, gemessen mit einem quasiadiabatischen Kalorimeter.

Verhalten der aeroben und anaeroben Oxidation von Hefen unter dem Einfluß von Giften

In der Phase B (Abb. 4) herrschen am Anfang physiologische Bedingungen. Die Kurven haben den gleichen Verlauf wie in Phase B von Abbildung 3. Nach Zugabe des Giftes ($KCN 6 \cdot 10^{-3}$ g/l) wird die aerobe Oxidation gehemmt, dabei vermindert sich die Gesamtwärmeproduktion. Nach Beginn der Phase C vermindert

sich nochmals die Gesamtwärmeproduktion, da nur noch die anaerobe Komponente der Oxidation einen Beitrag zur Wärmeproduktion liefert.

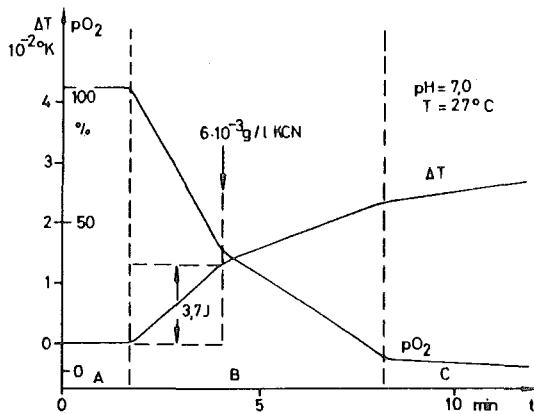


Abbildung 4: Sauerstoffumsatz und Wärmeproduktion beeinflusst durch die Zugabe eines Giftes ($6 \cdot 10^3 \text{ g/l KCN}$)

Experimentelle Ergebnisse

Testung spezifischer Wasserbelastungsstoffe kalorisch-respiratorisch

Messung der Stoffwechselwirkung von Umweltchemikalien mit dem Biokalorimeter.

Der Nachweis von umweltbelastenden Schadstoffen durch Untersuchung ihrer Stoffwechselrelevanz auf Mikroorganismen wird mit einem Biokalorimeter durchgeführt, das simultan die Wärmeabgabe und die Sauerstoffzehrung von Testkeimen erfaßt.

Dazu werden die Testkeime mit dem Schadstoff vorinkubiert und anschließend die Wärmeabgabe und die Sauerstoffzehrung gemessen. Der Grad der Keimschädigung wird durch Vergleich der Meßwerte mit unbelasteten Kontrollwerten erreicht. Voraussetzung für diese Methode ist ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit der Meßwerte.

Material und Methoden

a) Testkeime

Ziel des Toxizitätstests ist es, mit Hilfe verschiedener Hefe- und Bakterienstämme parallel oder sequentiell eine möglichst große Zahl von Giftgruppen aufzuzeigen. Aus der Vielzahl der sich anbietenden Mikroorganismen wurden in den vorliegenden Untersuchungen die folgenden ausgewählt:

- *saccharomyces cerevisiae*
- *pseudomonas putida* (Stamm Berlin)
- lyophilisierte und später resuspendierte *pseudomonas putida* (Stamm Berlin)

Die Bakterien lagen in Form von gewaschenen Suspensionen aus Fermenterkulturen vor (Anzucht in Standard-I-Nährboullion (MERCK) bei 27°C). Die im Versuch einzustellende Keimzahl orientiert sich an der Sauerstoffzehrung bzw. dem zur Verfügung gestellten Sauerstoff in der Reaktionsflüssigkeit.

Optimale Meßbedingungen ergeben sich, wenn der Sauerstoff in 4 bis 5 min nach der Keimzugabe verbraucht wird. Diese Zeit reicht aus, um deutlich eingeschwungene Meßbedingungen zu schaffen, andererseits sind die Effekte deutlich und schnell genug, um durch die Auflösung und Langzeitkonstanz des Meßsystems erfaßt zu werden.

Die Inkubationsdauer ist innerhalb einer Meßreihe möglichst konstant zu halten und auf die Abmessung der Flüssigkeitsmengen (Reaktionsflüssigkeit, Keimsuspension und Schadstoffverdünnung) ist höchste Präzision zu verwenden.

Die Temperierung der Flüssigkeiten erfolgte im Umwälzwasserbad; die zu inkubierenden Flüssigkeiten wurden durch Magnetrührer bewegt, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu gewährleisten.

b) Schadstoffe

Die folgenden Schadstoffe wurden aus der Liste der Referenzchemikalien der Priorität A des BMFT entnommen und getestet oder ergaben sich aus diesen Untersuchungen.

c) Untersuchungsmethodik

Grundsätzlich sind zwei Meßmethoden zu unterscheiden:

Ein Sofortmeßverfahren ohne Vorinkubation und ein Vergleichsmeßverfahren mit Vorinkubation. Im ersten Verfahren (siehe Abb. 5) wird der Meßverlauf einer Untersuchung intraindividuell beobachtet.

Untersuchung von Standardsubstanzen, speziellen Wasserbelastungsstoffen

Die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Bakterienarten und -stämme gegen Wasserschadstoffe wurden am Beispiel der Hemmung der Sauerstoffzehrung durch HgCl aufgezeigt (Tabelle 6).

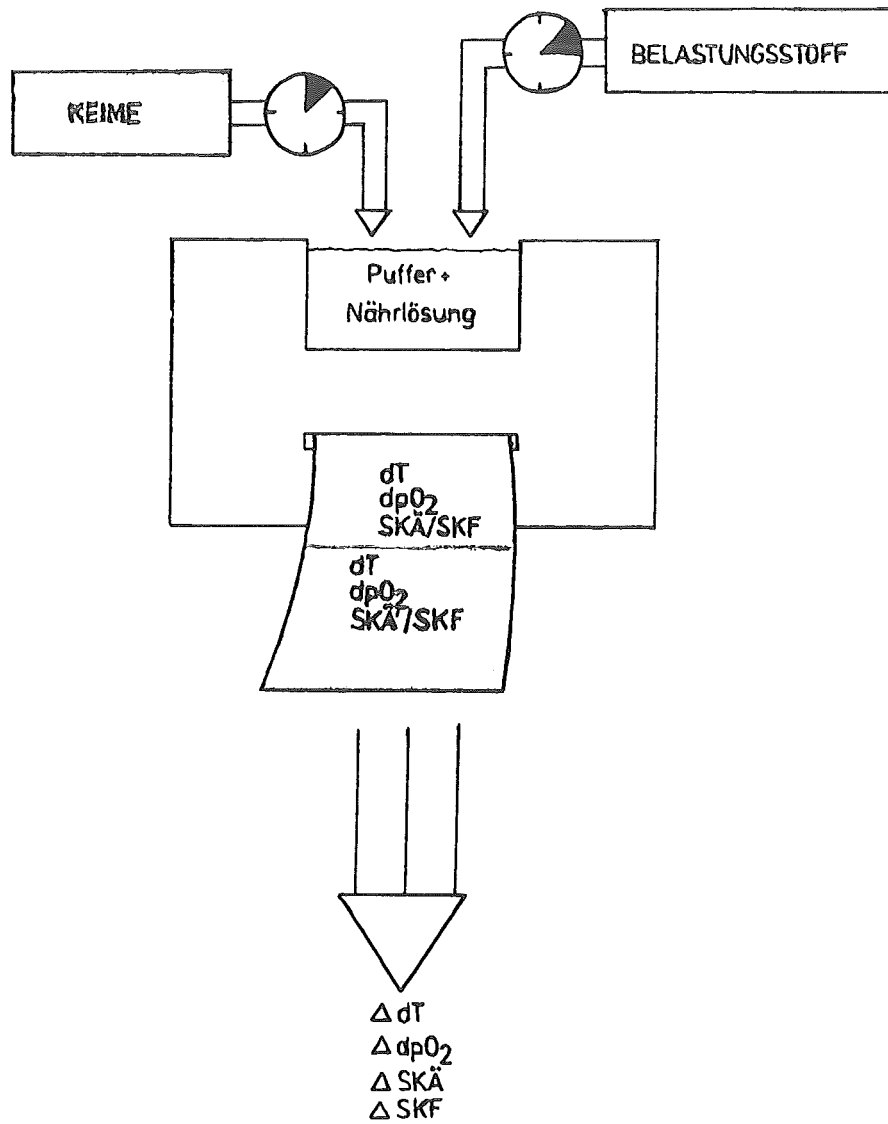


Abbildung 5: Bioenergetischer Toxizitätstest nach REIS, ohne Vorinkubation

K e i m a r t		O ₂ -Konsumptionsrate in % der Kontrolle
Aeromonas hydrophila	Nr. 30	100
Ps. fluorescens		96
Citrobacter freundii	Nr. 50	95
Enterobact. agglomerans	Nr. 52	86
Escherichia coli	Nr. 34	84
Klebsiella pneumoniae	Nr. 3	83
Enterobact. cloacae	Nr. 5	77
Serratia marcescens	Nr. 13	65
Aeromonas hydrophila C ₁ SATER		65
Ps. putida (St. Berlin 33/2)		65
Klebsiella pneumoniae	Nr. 9	57
Ps. aeruginosa	Nr. 15	51
Klebs. oceanae	Nr. 27	47
Klebs. pneumoniae	Nr. 4	47
Bac. cereus		40
Enterobact. cloacae	Nr. 6	37
Enterobact. cloacae	Nr. 7	37
Aeromonas hydrophila	Nr. 1	24
Enterobact. cloacae	Nr. 14	19
Bac. globigii		7
Chromob. violaceum		7
EKK 5 (BfG)		0

Tabelle 6: Unterschiedliche Empfindlichkeit diverser Bakterienarten bzw. -stämme gegen Wasserschadstoffe, dargestellt am Beispiel des Quecksilberchlorids (angew. Konzentration $1 \text{ mg Hg}^+ \cdot \ell^{-1}$)

Testkeim		Verbrauch mg O ₂ · l ⁻¹ · min ⁻¹	Gewässer / Herkunft
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		2,29	Bäckerei
<i>Pseudomonas putida</i>		2,15	Stamm Berlin 33/2 DSM Nr. 50026
<i>Enterobacter cloacae</i>	Nr. 47	1,92	Böhme bei Soltau am Waldbad
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 35	1,17	Wietze
<i>Serratia liquefaciens</i>	Nr. 28	1,09	Ilsterbach
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 36	1,05	Wietze
<i>Enterobacter cloacae</i>	Nr. 33	1,03	Kleine Örtze bei Kreutzen
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nr. 3	0,99	Zulauf Örtze
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nr. 4	0,99	Zulauf Örtze
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nr. 37	0,98	Wietze
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 1	0,95	Zulauf Örtze
<i>Enterobacter cloacae</i>	Nr. 5	0,95	Belebtschlamm Kläranlage Munster
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nr. 15	0,94	Rückhaltebecken am Hanloh
<i>Enterobacter mycoides</i>		0,92	
<i>Serratia marcescens</i>	Nr. 13	0,90	Muno-See
<i>Escherichia coli</i>	Nr. 11	0,84	500 m unterhalb Örtze-Kläranlage
<i>Enterobacter cloacae</i>	Nr. 6	0,83	Belebtschlamm Kläranlage Munster
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 30	0,80	Kleine Örtze bei Kreutzen
<i>Enterobacter cloacae</i>	Nr. 7	0,77	Belebtschlamm Kläranlage Munster
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nr. 9	0,76	500 m unterhalb Örtze-Kläranlage
<i>Citrobacter freundii</i>	Nr. 53	0,74	Böhme bei Soltau am Waldbad
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 2	0,74	Zulauf Örtze
<i>Citrobacter freundii</i>	Nr. 50	0,72	Böhme bei Soltau am Waldbad
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Nr. 52	0,70	Böhme bei Soltau am Waldbad
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	Nr. 41	0,70	Großes Moor bei Kleinamerika
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 45	0,69	Wietze
<i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ STATER		0,68	Schubert, Frankfurt
<i>Enterobacter cloacae</i>	Nr. 14	0,67	Örtze, Brücke Panzerring Breloh
<i>Serratia</i> spp.	Nr. 22	0,63	Flüggenhof-See
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 26	0,54	Mühlenteich Munster
<i>Serratia marcescens</i>		0,53	
<i>Aeromonas</i> spp.	Nr. 17	0,48	Rückhaltebecken am Hanloh
<i>Escherichia coli</i>	Nr. 20	0,46	Örtze-Brücke
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	Nr. 42	0,46	Großes Moor bei Kleinamerika
<i>Escherichia coli</i>	Nr. 34	0,44	Wietze
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 51	0,42	Böhme bei Soltau am Waldbad
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 25	0,38	Mühlenteich Munster
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 39	0,38	Suhrbach bei Mayerhof
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nr. 24	0,34	Fischteiche Panzerring
<i>Escherichia coli</i>	Nr. 46	0,29	Wietze
<i>Aerobacter</i> spp.	Nr. 43	0,29	Großes Moor bei Kleinamerika
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		0,28	
<i>Citrobacter freundii</i>	Nr. 31	0,23	Kleine Örtze bei Kreutzen
EKK 5		0,18	WWD
<i>Bacillus cereus</i>		0,16	WWD
<i>Escherichia coli</i>	Nr. 19	0,16	Muno-See
<i>Klebsiella oceanae</i>	Nr. 27	0,13	Mühlenteich Munster

Tabelle 7: Prüfung des O₂-Zehrungsvermögens diverser Mikroorganismen

Auswertung

Kalorimeterwerte:

Die Angabe der Wärmetönung in $K \cdot \text{min}^{-1}$ unter der Voraussetzung, daß 1 mV der Wärmetönung von $0,2 \cdot 10^{-3} K$ entspricht. Der Sauerstoffverbrauch wird über die geeichte Gel-Elektrode (WTW EO 16) in $\text{mg } O_2 \cdot \ell^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ angegeben.

Die Parameter SKF_O bzw. SKF_m stellen das Produkt der pro Zeiteinheit gemessenen Verbrauchswerte an Sauerstoff bzw. der Wärmetönung dar, während ΔSKF der prozentuale Änderung dieser Parameter ist. $SK\ddot{A}$ bezeichnet dagegen den Quotienten aus Wärmetönung und Sauerstoffzehrung bzw. $\Delta SK\ddot{A}$ die Änderung des Quotienten.

Auswertungsverfahren

Die Ermittlung von Wärmetönungs- und Sauerstoffzehrungsmeßwert erfolgt durch lineare Näherung der Meßkurven im eingeschwungenen Zustand und Ermittlung der durchschnittlichen Steigungen. Es ergeben sich die Meßwerte für die Wärmetönung dT in $10^{-3}K/\text{min.}$, für die Sauerstoffzehrung dpO_2 in $\text{mm Hg}/\text{min.}$, für die Schadstoffmessung und die Kontrollmessung, sowie ihre Differenzen in Prozent des unbelasteten Wertes: (mit/ohne Schadstoff)

$$\Delta dT = \frac{dT_{\text{ohne}} - dT_{\text{mit}}}{dT_{\text{ohne}}}; \quad \Delta dpO_2 = \frac{dpO_{2 \text{ ohne}} - dpO_{2 \text{ mit}}}{dpO_{2 \text{ ohne}}}$$

Das Produkt aus Wärmetönung und Sauerstoffzehrung, der Sauerstoff-Kalorien-Faktor SKF und seine Veränderung nach Schadstoffzugabe sind Indikatoren für den jeweiligen Belastungsgrad der Meßflüssigkeit:

$$SKF = dpO_2 \cdot dT \quad ; \quad \Delta SKF = \frac{SKF_O - SKF_m}{SKF_O}$$

Die Darstellung dieser Meßwerte in Abhängigkeit von der Schadstoffkonzentration führt bei der Untersuchung von Verdünnungsreihen verschiedener Umweltchemikalien zu Graphiken der Dosis-Wirkungsbeziehungen, deren Kurvenverläufe durch geeignete Anpassungen (logarithmisch oder exponentiell) angenähert werden. Die Signifikanz der Schadstoffwirkung wird durch einen t-Test (nach STUDENT) für unabhängige Stichproben überprüft. Verteilungsuntersuchungen werden mit der Probitanalyse durchgeführt.

Vgl. STUDENT: The probable error of a mean.
Biometrika 6, (1908), 1-25.

Schadstoff	Testkeim	EC ₅₀ [ppm]	EC ₀ [ppm]
Phenol	ps. putida	394	40
	Enterobacter	93	28
PCP	ps. putida	6,9	1,6
	E.coli	130	33
Hexachlorbenzol	serr. marcescens		0,013
n-Dodecylbenzolsulfonat	E.coli	113	34
2,4 D	E.coli	107	8,6
HgCl ₂	ps. putida	3,6	0,2
	Enterobacter	2,9	0,7
Äthylacetat	ps. putida	373	47,3
Trichloräthylen	ps. putida		149
1,2,4-Trichlorbenzol	ps. putida		4,2
Kaliumdichromat	ps. putida	0,83	0,1
Toluol	E.coli		16
4-Nitrophenol	staph.aureus	64,3	16,7
2-Nitrophenol	staph.aureus	1058	6

Tabelle 8: Exemplarisch-spezifische Wasserbelastungsstoffe mit verschiedenen Testkeimen (EC₅₀ - 50% Effektdosis, EC₀ - auflösbare Grenzkonzentration).

Es konnte gezeigt werden, daß mit der biokolorimetrischen Meßmethodik die Empfindlichkeit anderer bekannter Toxizitätsteste erreicht werden kann.

Ergebnisse

In Tabelle 9 sind die Grenzkonzentrationen sowie die 50% Dosis-Wirkungs-Beziehungen für verschiedene Substanzen, getestet an unterschiedlichen Bakterien, aufgelistet.

Schadstoff	Testkeim	EC ₅₀ ppm	EC ₀ ppm	EC ₀ [#] ppm
Hexachlorbenzol (reinst)	Serratia marcescens (60)			12,5 · 10 ⁻³
Benzol (z. Synthese)	Ps. putida			108
Phenol (p.a.)	Ps. putida	394	40	
	Enterobacter (54)	180	28	
	Alcaligenes faecalis	700	--	
	Serratia marcescens	1000	125	
	Staph. aureus			125

Tabelle 9

Schadstoff	Testkeim	EC ₅₀ ppm	EC ₀ ppm	EC ₀ [*] ppm
PCP (oekanal)	Ps. putida E. coli O26 : B6 Enterobacter(54)	6,9 130	1,6 32,6	< 7,9
Anilin	Saccharomyces cerevisiae Ps. putida E. coli O26 : B6	753	215	> 700 > 740
p-Chloranilin (Prosynth)	Ps. putida E. coli Algaligenes faecalis Enterobacter(54) Staph. aureus	1034 874	100 134	< 56 15 280
n-Dodecylben- zolsulfonat (technisch) Dodecylbenzol- sulfonsäure- methylester (reinst)	E. coli O26 : B6 E. coli (46)	113	34	322
2,4-D (oekanal)	E. coli O26 : B6	107	8,6	
HgCl ₂ (reinst)	Ps. putida Enterobacter(54)	3,6 2,86	< 0,2 0,7	
Methanol	Ps. putida			< 3800
Äthylacetat	Ps. putida E. coli	373 1354	47,3 215	
Trichloräthylen	Ps. putida			< 149
1,2,4-Trichlor- benzol	Ps. putida E. coli O26 : B6			≤ 4,2 ~ 9,9
Sulfanilamid (pharm.)	Ps. putida			1500
Naphtalin	Ps. putida E. coli O26 : B6			4,1 > 1
2,4-Dichlorphe- nol (Prosynth.)	Ps. putida			< 94
Kaliumdichromat	Ps. putida	0,83	< 0,1	
Aceton	Serratia marcescens(60)			3750
Toluol	E. coli O26 : B6			≥ 16,1
Nitrobenzol "rein"	E. coli O26 : B6			≥ 16,1
4-Nitrophenol "Indikator"	Staph. aureus	64,3	16,7	
2-Nitrophenol p.a.	Staph. aureus	1058	5,8	
BASF-"Compo" (Mischgift)	Ps. putida	1055	105	

Dosis-Wirkungsbeziehungen

- Dosis bei 50% Hemmung
- untere Grenzdosis
- untere Grenzkonzentration, wobei keine kontinuierliche Dosis-
Wirkungskurve ermittelt wurde

EC₅₀
EC₀
EC₀^{*}

Tabelle 9

Im einzelnen sind ausgewählte Resultate biokalorimetrischer Untersuchungsreihen in den Dosis-Wirkungs-Kurven der Abbildungen 6-9 dargestellt: Die Änderung des Sauerstoffkalorienfaktors (SKF) [24], des Produktes aus Wärmetönung und Sauerstoffzehrung der Testkeime durch Belastung mit verschiedenen toxischen Modellsubstanzen ist über der Schadstoffkonzentration (in ppm) aufgetragen. Die Veränderungen werden in Prozent der Nullkontrolle angegeben; die 50% Effektdosis ist in den Diagrammen explizit eingetragen.

Die einzelnen Punkte der Diagramme ergeben sich aus Gründen der statistischen Absicherung als Mittelwerte aus mehreren Einzel- und Kontrollmessungen, die Kurvenverläufe sind lineare oder logarithmische Kurvenanpassungen.

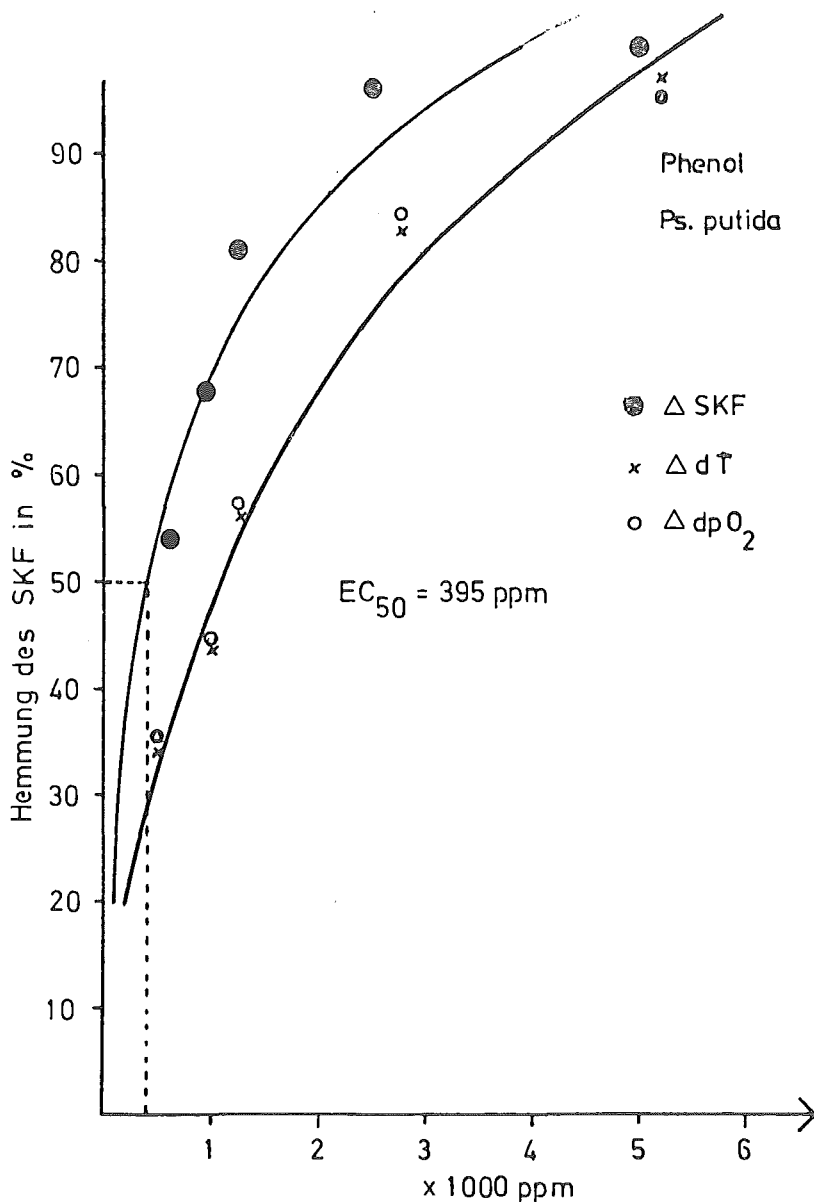


Abbildung 6: Dosis-Wirkungsbeziehung
Substanz : Phenol
Testkeim : Ps. putida

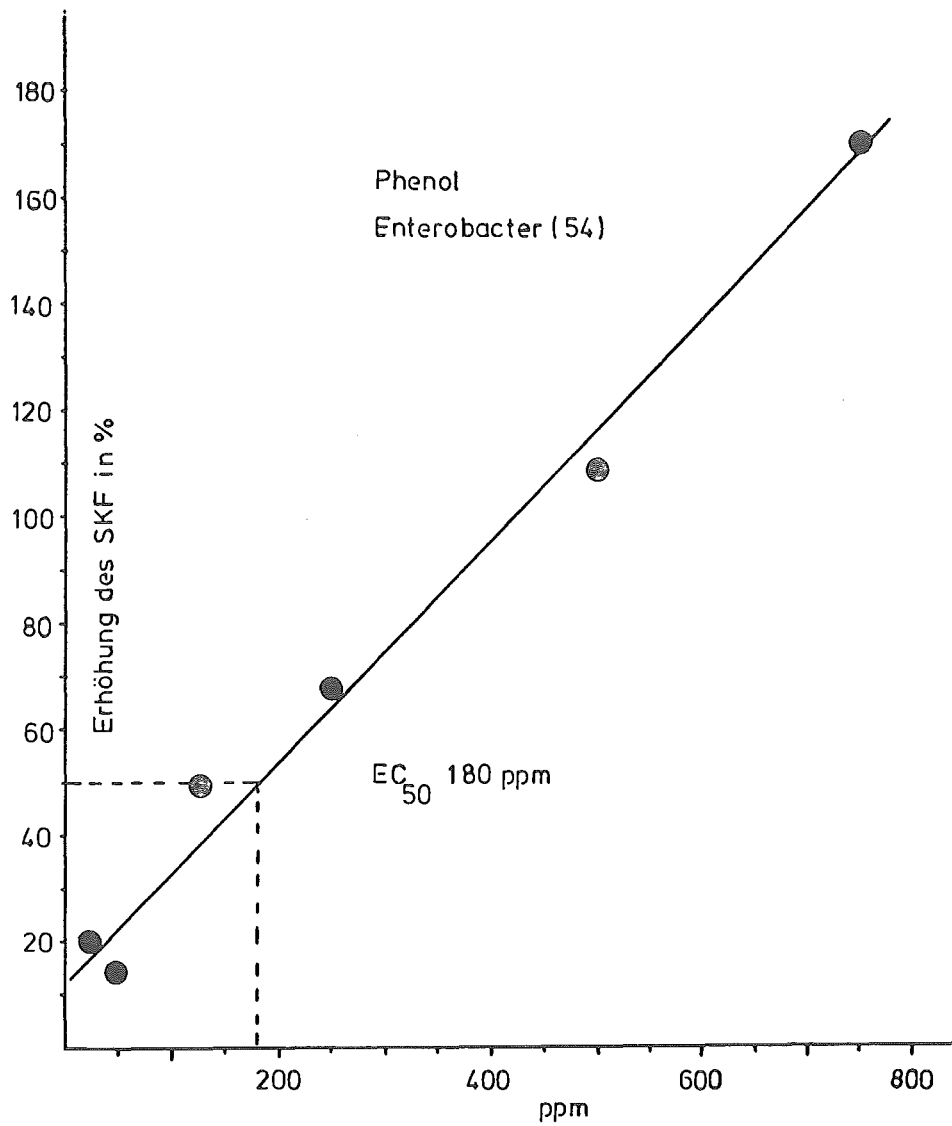


Abbildung 7: Dosis-Wirkungsbeziehung

Substanz : Phenol

Testkeim : Enterobacter (54)

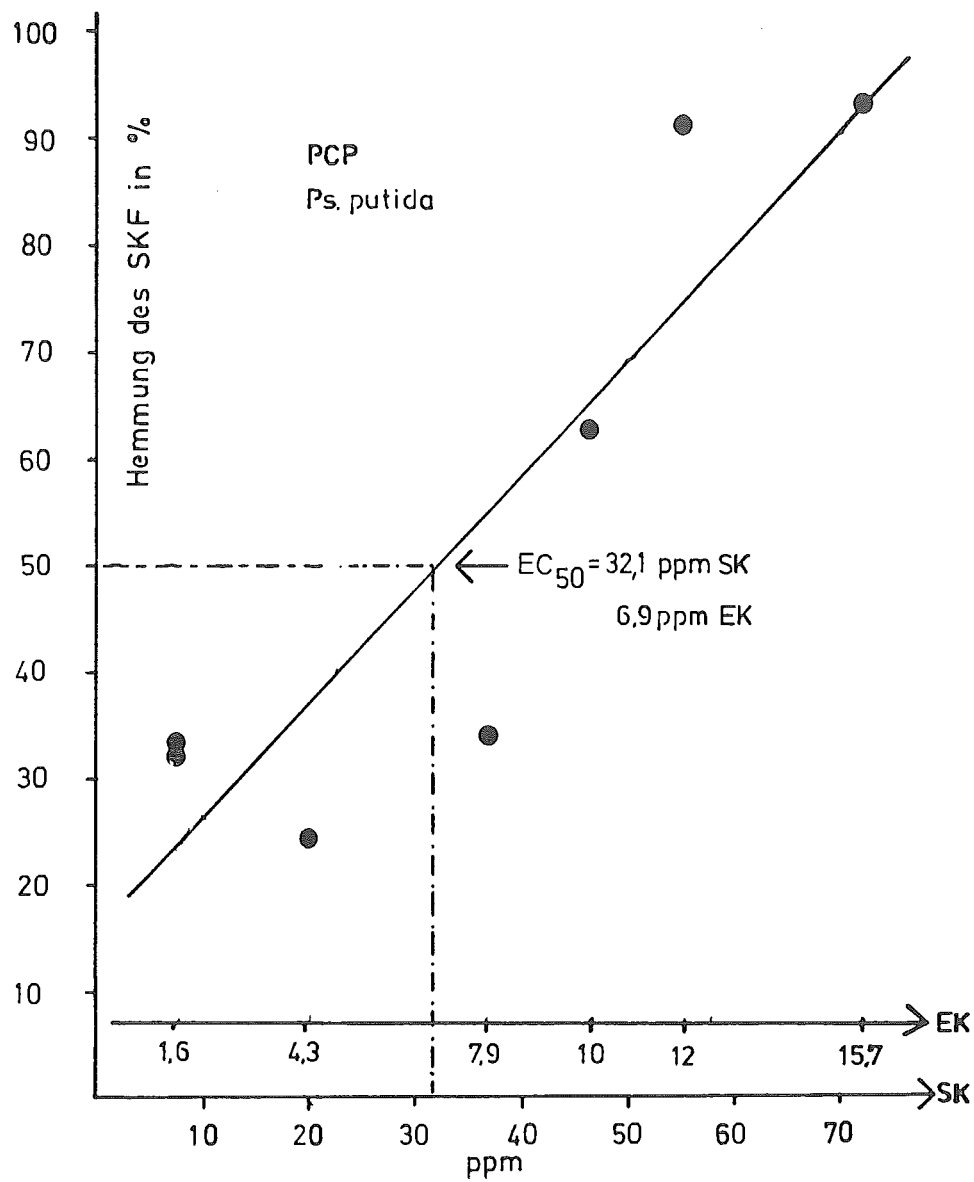


Abbildung 8: Dosis-Wirkungsbeziehung

Substanz : PCP (oek.)

Testkeim : Ps. putida

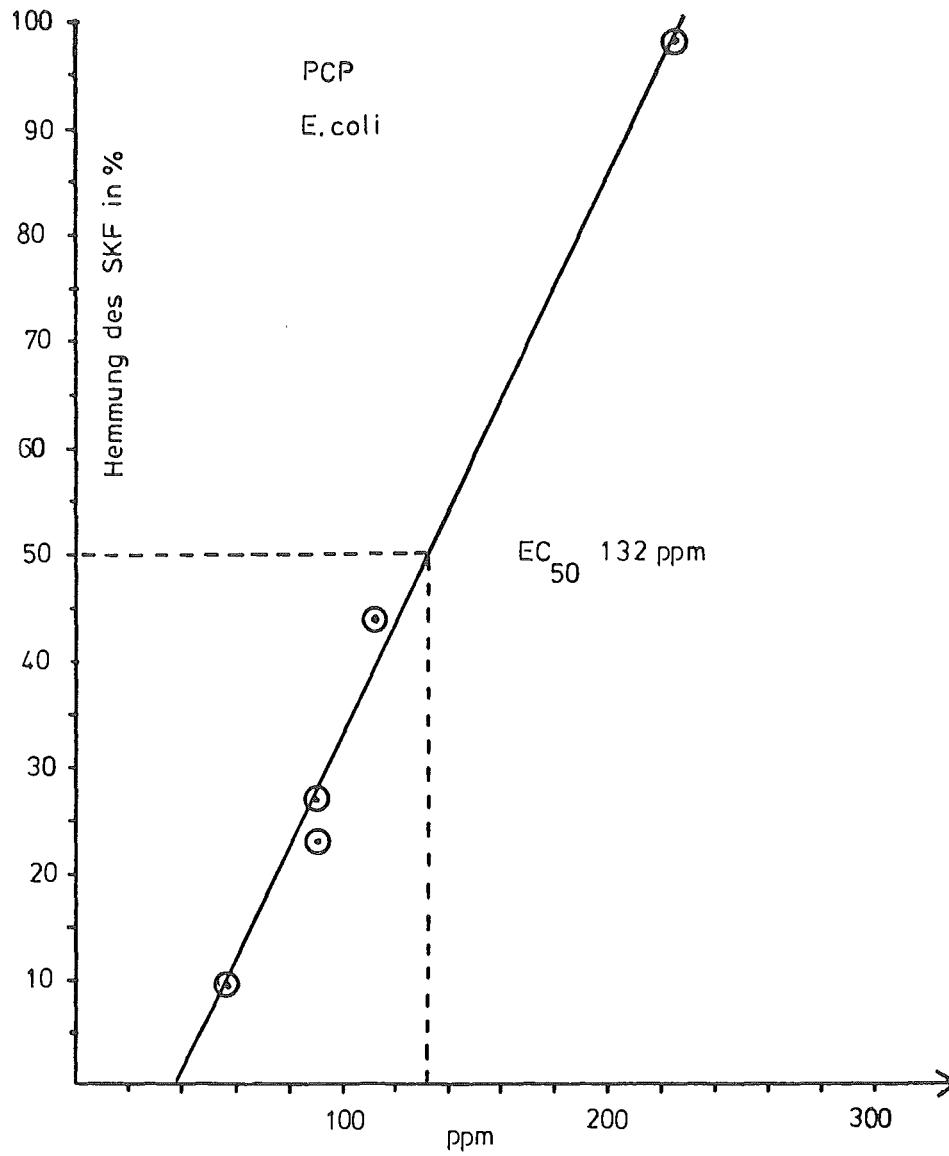


Abbildung 9: Dosis-Wirkungsbeziehung

Substanz : PCP (oek.)

Testkeim : E.coli 0₂₆:B₆

LITERATUR:

- [1] EICHHOLZ, F.: Die toxische Gesamtsituation auf dem Gebiet der menschlichen Ernährung. Verlag J. Springer, Berlin, 1956
- [2] EICHHOLZ, F.: Biologische Existenz des Menschen in der Hochzivilisation. Verlag G. Braun, Karlsruhe, 1969
- [3] REIS, A.: Die anodische Oxidation als Inaktivator pathogener Substanzen und Prozesse. Klinische Wochenschrift 19, 1951, S. 484
- [4] BÜCHNER, F.: Struktur, Stoffwechsel und Funktion in der modernen Pathologie. Urban und Schwarzenberg, München-Wien, 1964
- [5] REIS, A.; EIBER, H.: Verfahren und Einrichtung zur quantitativen Bestimmung der Oxidationsinsuffizienz bei Stoffwechselkrankheiten. Klin. Wochenschrift 42, 1964, S. 176
- [6] REIS, A.; BÜRGER, P.: Das Sauerstoff-Kalorienäquivalent der biologischen Verbrennung und seine Beeinflussung durch Pharmaka. Elektromedizin 12, 1967, S. 183
- [7] LEHNINGER, A.L.: Bioenergetik. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1970
- [8] HOLTEN, C.H.: Lactic Acid. Verlag Chemie, Weinheim, 1971
- [9] RICHTERICH, R.: Enzympathologie. Springer-Verlag, Berlin, 1958
- [10] HAAS, J.: Physiologie der Zelle: Verlag Bornträger, Berlin, 1955
- [11] ZÖLLNER, N.: Lehrbuch des Stoffwechsels. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1956
- [12] WEINFURTER, F.: Die Hefen in der Wissenschaft. Verlag H. Carl, Nürnberg, 1960
- [13] LEHNINGER, A.: The Mitochondrion. W.A.-Benjamin, New York, 1965
- [14] WEBB, J.L.: Enzyme and Metabolic Inhibitors. Academic Press New York, London, 1963
- [15] CLARK, A.J.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Band 4, Springer-Verlag, Berlin, 1937
- [16] BÜCHNER, F.: Allgemeine Pathologie. Urban-Schwarzenberg, München-Wien, 1966
- [17] TOEDT, F.: Zeitschrift f.d. Zuckerindustrie. 20, 1970, S. 528
- [18] BECKMAN INSTRUMENTS: Oxygen Macro Electrode, PG-TB-003, Sept. 1964
- [19] Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Verlag Chemie, Weinheim, 1960
- [20] AXT, G.: Ergebnisse kontinuierlicher Toxizitätsmessungen mit Bakterien. Vom Wasser, 41, 1973, S. 409-414
- [21] TERVEEN, A.: Diplomarbeit an der Technischen Universität München, 1975
- [22] REIS, A.: Bioenergetischer Toxizitätstest. GIT-Verlag, 19, Sept. 1975, S. 758
- [23] GRAINGER, J.; LOCKER, A.: Quantitative Biologie auf Metab. Springer-Verlag, 1968, S. 86-90, 1967
- [24] SCHAUERTE, W.: Respirationskalorimetrische Untersuchungen des Umweltbelastungsgrades von Schadstoffen. 14. Jahrestagung der Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Kongressband, Sept. 1980, S. 391

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (0372915)

Mikrokalorimetrisches Verfahren zur ökotoxi-
kologischen Beurteilung von Umweltchemikalien

Teil I: Mikrokalorimetrische Untersuchungen
an kontinuierlich gehaltenen bakte-
riellen Reinkulturen

von

Prof. Dr. Dieter Schuller

Dipl. Biol. Peter Weppen

Arbeitsgruppe Ökochemie und Umweltanalytik
Fachbereich Chemie
Universität Oldenburg

August 1984

Mikrokalorimetrisches Verfahren zur ökotoxikologischen Beurteilung von Umweltchemikalien

Teil I: Mikrokalorimetrische Untersuchungen an kontinuierlich gehaltenen bakteriellen Reinkulturen
(Dieter Schuller, Peter Weppen, AG Ökochemie und Umweltanalytik, Fachbereich Chemie)

Zusammenfassung: Mit dem neu entwickelten Wärme flu ß kalorimeter kann die thermische Leistung chemoorganotropher, aerober Bakterienkulturen unter fast beliebig wählbaren Kulturbedingungen mit guter zeitlicher Auflösung ermittelt werden. Die Wärmestrom-Zeit Funktionen toxisch belasteter mikrobieller Populationen ermöglichen die Ermittlung toxikologischer Kenngrößen.

Für die Interaktion von Schadstoffen mit Mikroorganismen und die Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Population wurden Modellansätze entwickelt.

Die Arbeiten wurden vergleichend an den Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Escherichia coli*, unter Verwendung von Phenol, 2-Nitrophenol, 4-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, Pentachlorphenol und Quecksilber-II-Chlorid durchgeführt.

Microcalorimetric investigations with continuous cultures of monobacterial populations.

Abstract: A new type of heat-flow calorimeter gives the possibility, to determine the heat flow from continuous cultures of chemoorganotrophical, aerobic bacteria, with a very good time-dissolution and within widely variable physiological conditions of the culture.

The heat-flow versus time-function of intoxicated cultures leads to the determination of toxicological data.

The interaction of toxic substances with the microorganisms and the dependence of the physiological state of the population has been modelled. Work has been comparatively done with the bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Escherichia coli*, using phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, pentachlorophenol and mercury-(II)-chloride as toxins.

MIKROKALORIMETRISCHES VERFAHREN ZUR ÖKOTOXIKOLOGISCHEN BEURTEILUNG VON UMWELTCHEMIKALIEN

Toxikologische Testmethoden zur Einschätzung der Wirkung von Chemikalien in der Umwelt haben große Bedeutung erlangt¹. Darunter Testmethoden, die mikrobielle Populationen als Target heranziehen^{2/3}. Aus ökologischer Sicht wird der Analyse von biozönotischen Effekten einerseits und der Beurteilung von Schadeffekten gegenüber Stoff- und Energieflüssen im Ökosystem andererseits^{5/6} das Hauptinteresse gewidmet.

Mikrobielle Batch-Testsysteme, wie Microtox-Assay⁷, Wachstumshemmungstests³, Kurzzeit Respirationstests⁸, zeichnen sich durch testbedingte, extreme, invariable physiologische Zustände der mikrobiellen Testpopulationen aus. So werden entweder Zellen verwendet, die in reinen Pufferlösungen auf der Grundlage einer Kohlenstoffquelle ausschließlich respirieren oder es werden Bedingungen unbegrenzten exponentiellen Wachstums realisiert. Die ökologisch eher wahrscheinliche Situation limitierter Energie-Ressourcen für heterotrophe Stoffwechselvorgänge wird jedoch nur äußerst selten zur Beurteilung toxischer Wirkungen von Chemikalien herangezogen (Mayfield et al.⁹, Chemostatkulturen von Bakterien-Mischpopulationen).

Die Möglichkeit, über einfach kontrollierbare Parameter die physiologische Situation bakterieller Populationen konstant zu erhalten, hat uns bewogen, die Chemostatkultur aerober chemoorganotropher Bakterien als Modellsystem für die mikrobielle "Destruentenbiozönose" aquatischer Ökosysteme heranzuziehen. Die Technik sowie theoretische Betrachtungen zum Stoffhaushalt der Chemostatkultur sind lange bekannt^{10/11}. Auch liegen bereits wenige Ergebnisse zu Effekten von Hg^{II} und von Antibiotika in Chemostatkulturen vor¹²; frühere eigene Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae*¹³ unter dem Einfluß von PCP waren Grundlage für die Antragstellung zu diesem Vorhaben.

Biokalorimetrie als Meßverfahren der physikalischen Chemie wurde schon recht frühzeitig (Calvet-Kalorimeter) in breitem Umfang zur Analyse physiologischer Fragestellungen an Mikroorganismen herangezogen, wobei, bedingt durch die apparativen Gegebenheiten, Batch-Tests dominierten. Einen sehr umfassenden Überblick vermittelt Beezer (1980)¹⁴ über den Stand der apparativen, wie experimentellen Biokalorimetrie.

Kalorimetrische Untersuchungen zur Energetik der Chemostat-Kultur wurden zuerst von Cardoso-Duarte et al (1976)¹⁵ sowie Brettel et al^{16/17} ausgeführt, wobei Flow-Kalorimeter zum Einsatz kamen, die eine Trennung zwischen Kultur- und kalorimetrischem System gestatteten. Die Untersuchung von Steady-State Zuständen erforderte einen einfachen Korrekturterm zur Rekalkulation des Wärmestromes der Chemostat-Kultur aus den kalorimetrischen Messungen, bedingt durch die Verweilzeit der Probe im Versorgungssystem der Flow-Kalorimeter¹⁵.

Marti et al demonstrierten 1979 (isoperiboles-Batch-Kalorimeter) die Möglichkeit, die Dynamik des Energieflusses wachsender Bakterienpopulationen mit einem Kalorimeter extrem langer Zeitkonstante durch Anwendung der Tian-Transformation gut aufgelöst zu erfassen¹⁸. Das einfache Isoperibol-Kalorimeter von Marti et al diente uns als Grundlage für die Entwicklung eines Zwillings-Wärmeflußkalorimeters, das die Chemostatkulturen chemoorganotropher aerober Bakterien direkt in den belüfteten und mediumdurchströmten kalorimetrischen Meßzellen beherbergt.

Das neue Eigenbau-Kalorimeter gestattet durch die Nutzung der Entzerrung von Thermogrammen nach dem Tian-Verfahren¹⁹ die Aufnahme von Wärmestrom-Zeit-Funktionen toxisch belasteter Chemostat-Populationen mit guter zeitlicher Auflösung und wurde von uns bisher zur Bestimmung toxikologischer Kenngrößen für die Schadwirkungen von Chemikalien der Prioritäts-Liste²⁰ herangezogen²¹. Darüber hinaus ermöglichten unsere Messungen durch Hinzuziehung der Konzentration Biomasse und der limitierenden Kohlenstoffquelle der Chemostatkultur nach toxischer Belastung die Formulierung von Hypothesen zu verschiedenen Wirkungsmechanismen von Noxen gegenüber mikrobiellen Populationen²². Diese Hypothesen legten nahe, daß zwischen dem physiologischen Zustand der Chemostatkultur und ihrem Response auf toxische Schockbelastungen signifikante Zusammenhänge bestehen, die durch weitergehende Untersuchungen eine Bestätigung fanden. Die Analyse von Dosis-Wirkungs-Reihen und deren Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Population sollen demnächst Eingang finden in ein pragmatisches Modell der Interaktion von Schadstoffen mit Mikroorganismen und dem resultierenden Response der Wärmestrom-Zeit-Funktion.

MATERIALIEN UND METHODEN

Toxikologische kalorimetrische Studien wurden vergleichend an den Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Escherichia coli* (aus Belebtschlamm einer kommunalen biologischen Kläranlage isoliert),

ausgeführt. Modellchemikalien: Phenol (z. A. Merck), 2-Nitrophenol (Oekanal), 4-Nitrophenol (Oekanal), 2,4-Dinitrophenol (Serva Feinbiochemika), Penta-chlorphenol (Ega 99⁺%) und Quecksilber-II-Chlorid (Oekanal).

Testmedium für alle Species: Vollsynthetisches Kulturmedium (Na_2HPO_4 - 6.55 mM, KH_2PO_4 - 3.42 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3.78 mM, CaCl_2 - 0.068 mM, MgSO_4 - 0.406 mM, ergänzt um je 1 ml/l der Spurenelementelösung und der Fe-EDTA-Lösung nach Rippka et al²⁹. Kohlenstoffquelle: In den Experimenten mit *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* Glucose; in den Untersuchungen an *Acinetobacter* Natrium-Acetat).

Batch-Tests wurden mit 1 g/l der Kohlenstoffquelle ausgeführt, Chemostat-experimente mit 2 mM Glucose b.z.w. 6 mM Natrium-Acetat als limitierende Kohlenstoffquelle. Die experimentellen Arbeitsbedingungen wurden im Detail für *Acinetobacter*-Kulturen kürzlich beschrieben²¹.

TOXIKOLOGISCHE REFERENZMETHODEN

Die Bestimmung toxischer Referenzkenndaten konnte nur im Hause mit den isolierten Stämmen erfolgen, da bakteriologische Toxizitätskennwerte nur mit Vorsicht zwischen verschiedenen Stämmen oder Species übertragbar sind (unveröff. eigene Befunde). Zum einen nutzten wir einen respiratorischen Kurzzeittest, in dem Zellsuspensionen einer Biotrockenmassekonzentration von 30 mg/l aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase in Gegenwart einer exponentiell gestaffelten Testchemikalien-Konzentrationsreihe hinsichtlich ihrer Respirationsrate vermessen werden. Als Meßgerät diente der YSI-Model 53 Biological Oxygen Monitor. Die gemessenen Respirationsraten werden relativ zu den Respirationsraten von Nullkontrollen zu IC 50 Daten und toxischen Grenzkonzentrationen verarbeitet^{8/1}.

Die zweite Referenzmethode ist ein optischer Wachstumstest. Ausgehend von exponentiell wachsenden Vorkulturen werden Testansätze und Kontrollkulturen erstellt und deren Wachstum als Zunahme der OPTISCHEN DICHTEN photometrisch ermittelt. Aus den OD-Daten wird die Wachstumsrate kalkuliert und in Bezug auf die Kontrollansätze eine Bestimmung der IC 50 und der toxischen Grenzkonzentration bezogen auf die Wachstumsrate errechnet.

KALORIMETRISCHE LEISTUNGSDATEN

Der kalorimetrische Prototyp entsprechend unserer Beschreibung¹³ wurde mit einer neuen kompakten und handhabungsfreundlichen Meßzellenanordnung ausgestattet, deren kalorimetrische Leistungsdaten durch elektrische Kalibrier- versuche mit Hilfe ohmscher Eichwiderstände und Wärmeentwicklung durch den

JOULE Effekt ermittelt wurden. Besonders bedeutsam erschienen Analysen von Drift, Rauschen und zeitlicher Auflösung in Abhängigkeit von der Medium-Flow-Rate (die den physiologischen Zustand der Testkulturen bestimmt).

ERGEBNISSE DER EXPERIMENTELLEN ARBEITEN

Abb. 1 zeigt das Biokalorimeter für on-line Monitoring von Chemostat-Kulturen in der Gesamtansicht. Abb. 2 gibt einen schematischen Überblick über die neue komfortable Meßzelleneinheit, die in einem Teil die Arbeits-Meßzelle und eine identische Referenzmeßzelle enthält. Die Bioreaktoren dieser neuen Anordnung besitzen ein Arbeitsvolumen von 140 ml, so daß ohne übermäßigen Mediumverbrauch auch toxikologische Studien bei geringen Verweilzeiten der Kultur, das entspricht hohen spezifischen Wachstumsraten im steady-state, realisierbar sind.

Der elektronisch geregelte Feinthermostat (Abb. 1) ermöglicht Messungen bei Temperaturen zwischen 5 und 60 °C sofern ein Arbeitsraum mit einer niedrigeren Temperatur zur Verfügung steht. Als Standard wurden unsere Untersuchungen bei 30 °C ausgeführt.

Um durch Anwendung der Tian-Transformation zu richtigen kalorimetrischen Daten zu gelangen, ist eine genaue Erfassung der Wärmeleitungsfunktion des Kalorimeters sowie des Signifikanzniveaus (hier Rauschpegel) nötig: Der Mediumdurchstrom durch die Meßzellen ist konstruktives Element, das die Etablierung von Chemostat-Kulturen in den Meßzellen und die freizügige Einstellung ihrer Wachstumsparameter erst ermöglicht. Der Medium-Flow durch die Kalorimeter-Meßzellen besitzt additiven Charakter für den Wärmeleitwert zwischen Meßzelle und isothermer Umgebung (Abb. 3). Der additive Term, der aus dem Medium-Flow resultiert, ist das Produkt aus Wärmekapazität des Mediums und Medium-Flow-Rate. Gemessene Werte und kalkulierte Werte stimmen in sehr guter Näherung überein. Dies und die Linearität der experimentell gefundenen Funktion ermöglichen es, ohne spezifische Kalibrierung des Kalorimeters bei definierter Flow-Rate den Flow-Wert in die Gesamt-Gleichung nach Tabelle 1 einzubeziehen.

Der Meßzellenbelüftung wurde großes Augenmerk gewidmet. Die Belüftung entspricht einem kleinen exothermen Effekt aufgrund der mechanischen Rührung sowie einem größerem endothermen Effekt aufgrund der isothermen Dekompression der Luft beim Durchtritt durch die Gasverteilungsfritte. Die Summe beider Effekte führt zu stationären Verschiebungen der Kalorimeter-Nulllinie, wie in Abb. 4 dargestellt ist. Der endotherme Effekt der isothermen Dekompression hängt vom Volumendurchsatz an Luft und vom Differenzdruck beim

Durchtritt durch die Gasverteilungsfritte ab. Dieser Δp -Wert kann durch bakterielles Wachstum in den Poren der Fritte stark ansteigen, ist damit Hauptursache für eine geringfügige negative Drift der kalorimetrischen Messdaten in Langzeitstudien. Wärmeleitwert und Zeitkonstante erster Ordnung beeinflussen die Variation der Belüftungsrate im dargestellten Bereich nicht signifikant.

Unter experimentellen Standardbedingungen (30 °C, Belüftungsrate 160 ml/Minute) wurden als Minimum-Leistungsdaten für den Signal-Rausch-Abstand unter Einbeziehung der Transformation nach Gleichung(1) in Tabelle 1 die Kurvenzüge nach Abb. 5 für verschiedene Medium-Flow-Raten gefunden. Als Zeitintervall für die Datentransformation wurden 300 sek gewählt, eine Glättung der Ergebnisdaten erfolgte nicht.

Tabelle 1: Die Wärmeleitungsgleichung für das Eigenbau-Wärmeleitungs-kalorimeter

$$\dot{Q}(t_1 t_2) = \left[\underset{\text{I}}{a} \cdot \underset{\text{II}}{\sqrt[3]{\left(\frac{\Delta T_1 + \Delta T_2}{2} + b + k \cdot Fr \right)}} \right] \cdot \underset{\text{III}}{\frac{\Delta T_1 + \Delta T_2}{2}} + \underset{\text{IV}}{c_{pZ}} \cdot \frac{\Delta T_2 - \Delta T_1}{t_2 - t_1}$$

Darin bedeuten die Terme

- I empirisch gefundener Korrekturterm für die Nichtlinearität der Wärmeleitung zwischen Meßzelle und isothermer Umgebung als $f(\Delta T)$
- II mechanisch vorgegebener Wärmeleitwert zwischen Meßzelle und Umgebung (Wärmeleitwert der VA-Stahl-Wärmeleitstrecke bei $\Delta T=0$)
- III Funktion für den Wärmeleitwert des Mediumdurchstromes durch die Meßzellen
- IV dynamischer Korrekturterm (Tian-Term) zur Entzerrung der Thermogrammdaten

- $a = 0.008496 \text{ K}^{-(1/3)} \text{ W K}^{-1}$
- $b = 0.2261 \text{ W K}^{-1}$
- $k = 0.00121 \text{ h ml}^{-1} \text{ W K}^{-1}$
- $Fr = \text{Medium Flow} \text{ ml h}^{-1}$
- $c_{pZ} = 998 \text{ J K}^{-1}$ (Wärmekapazität der Meßzelle mit Mediumfüllung)
- $\Delta T = \text{Differenztemperatur} \text{ K} \cdot 10^{-3}$

$\dot{Q}(t_1 t_2)$ Wärmestrom für das Zeitintervall $t_1 t_2$ $\text{W} \cdot 10^{-3}$

$t_2 - t_1$ Zeitdifferenz zwischen zwei Datensamples sek

Ein empirischer Leistungstest der zeitlichen Auflösung des Kalorimeters wurde mit einem Eichprogramm ausgeführt, das große Sprünge der Wärmestromfunktion sowie kleine Wärmestrom-Peaks enthielt. Bei diesem Test fanden wir eine Zunahme der Auflösung sowie eine Abnahme der Differenzen zwischen Original-Wärmestrom-Zeit-Funktion und der, aus dem Thermogramm mit obiger Gleichung rekonstruierten Funktion bis hin zu einer Zeitdifferenz von weniger als 300 sek für die Transformation. Eine höhere Transformationsrate erhöhte hingegen nur den Rauschpegel. Mit der Standard-Transformationsrate von 300 sek können Verdoppelungen des Wärmestromwertes innerhalb von 15 Min. zu mehr als 90 % erfaßt werden, was angesichts der großen Zeitkonstante erster Ordnung für unser Kalorimeter von etwa 3600 sek bei einem Medium-Flow von 0 einer recht guten Leistung in der zeitlichen Auflösung gleichkommt (zu Möglichkeiten und Grenzen der dynamischen Korrektur vergleiche auch Randzio & Suurkuusk¹⁹).

BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Unsere Kalorimeterkonzeption gestattet in Verbindung mit wenigen Peripherie-Geräten die Etablierung von langfristig stabilen und hochgradig reproduzierbaren Chemostatkulturen der oben genannten Bakterien-Species. Die Reproduzierbarkeit betrifft hierbei sowohl die Dilution-Rate als auch den steady state Stoffumsatz der Kulturen²¹.

Für kontinuierliche Kulturen der drei Bakterien-species wurden bei halb-maximaler steady state Wachstumsrate die Wirkungen der ausgewählten Modell-chemikalien ermittelt und nach der Bewertung der Effekte aus der Wärmestrom-Zeit-Funktion (Abb. 6) dargestellt und (Abb. 7) für vier Substanzen für *Acinetobacter calcoaceticus* zusammengefaßt, in toxikologische Kennwerte umgesetzt. Details dieser Auswertungspraxis sind bereits veröffentlicht²¹.

Die Bemessung des toxischen Effektes von Schadstoffen auf den katabolischen Stoffumsatz, der allein der kalorimetrischen Messung zugänglich ist^{24/25}, wird durch die Relation zwischen dem steady-state Wärmestrom und dem Wärmestrom aus der toxisch belasteten Kultur im ersten Maximum (entkoppelnde Chemikalien) oder Minimum (inhibierende Dosen) nach der Schock-Dosierung des Schadstoffes bestimmt. Der relative Response wird gegen den Logarithmus der Schadstoffkonzentration graphisch aufgetragen, was eine Linearisierung bewirkt, die eine lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung der IC 50 Konzentration und der toxisch wirkenden Grenzkonzentration ermöglicht.

Die kalorimetrische Toxizitätsbewertung an Chemostatkulturen nach diesem einfachen Konzept ermöglicht bereits die Bestimmung von drei bedeutsamen

Tabelle 2:

Toxikologische Standardgrößen für <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>							
(I) Kalorimetrische Bestimmung							
(II) Kurzzeit-Respirationshemmtest							
(III) Wachstums-Hemmtest							
Substanz	MEC (I)	MIC (I)	IC 50 (I)	MIC (II)	IC 50 (II)	MIC (III)	IC 50 (III)
Phenol	240	640	830	430	1300	340	660
2,4-Dinitrophenol	6.5	68	105	70	360	19	80
4-Nitrophenol	25	65	80	80	120	nt	nt
2-Nitrophenol	nb	3.5	15	1.7	80	2.5	11
Pentachlorphenol	nb	0.17	1.8	0.12	4.5	0.44	3.3
HgCl ₂	nb	0.22	0.45	0.02	0.09	0.02	0.16
Toxikologische Standardgrößen für <i>Escherichia coli</i>							
Zuordnung wie oben							
Substanz	MEC (I)	MIC (I)	IC 50 (I)	MIC (II)	IC 50 (II)	MIC (III)	IC 50 (III)
Phenol	150	640	1300	110	650	200	450
Pentachlorphenol	12	85	105	58	90	34	67
2-Nitrophenol	14	27	100	24	81	12	41
HgCl ₂	nb	1.9	2.7	0.18**	0.34**	0.016**	0.036**
Toxikologische Standardgrößen für <i>Klebsiella pneumoniae</i>							
Zuordnung wie oben							
Substanz	MEC (I)	MIC (I)	IC 50 (I)	MIC (II)	IC 50 (II)	MIC (III)	IC 50 (III)
Pentachlorphenol	5	41	100	46	81	52	94

Alle Angaben als Nominalkonzentration im Moment der Schadstoffzugabe
/ mg l⁻¹ /

nt nicht getestet

nb Effekt wurde nicht beobachtet

** Quecksilber-II-Toxizität zeigt starke Abhängigkeit von der Konzentration der Biomasse im Testansatz sowie eine langsame Aufnahmekinetik

Toxizitätskennziffern:

Minimum Effective Concentration ist die niedrigste Schadstoffkonzentration, die eine signifikante Erhöhung des Wärmestromes aus der Kultur gegenüber dem steady-state bewirkt. Diese Konzentrationsangabe scheint nach unserer Einschätzung Chemikalien mit Entkoppler-Wirkung auf den zellinternen Energietransfer zu charakterisieren.

Minimum Inhibitory Concentration benennt die Testkonzentration, die eine signifikante Verminderung des Wärmestromes aus der Population gegenüber dem steady-state Wert erbringt.

IC 50 Konzentrationen benennen die Schadstoff-Nominalkonzentration, die den Wärmestrom aus der Chemostat-Kultur auf 50 % des steady-state Wertes vermindern.

Nach unseren bisherigen Beobachtungen sind die MEC-Werte kleiner als die toxischen Grenzkonzentrationen der Batch-Tests, MIC-Daten aus der Kalorimetrie entsprechen etwa den toxischen Grenzkonzentrationen und IC 50 Daten aus allen drei Testmethoden sind näherungsweise identisch.

Als Ausnahme aus dieser Beobachtungsreihe wurden für Hg^{II} im kalorimetrischen Test generell höhere toxisch wirkende Konzentrationen gefunden, zugleich zeigten aber die Respirations-Kurzzeit-Tests mit Hg^{II} und Acinetobacter, daß die IC 50 Daten eine hohe positive Korrelation zur Biomassedichte im Testansatz besitzen, die ausreicht, um die geringe Toxizität von Hg^{II} im Kalorimetertest zu klären.

Eingehende Untersuchungen zur Biomasse-Abhängigkeit der Hg-Toxizität, die vor allem auch eine Messung realer Konzentrationen (frei gelöst, sowie in Zellen gebunden) beinhalten wird, sind gerade angelaufen.

WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN DEM PHYSIOLOGISCHEN ZUSTAND DER CHEMOSTATKULTUR UND IHREM RESPONSE AUF TOXISCHE STOFFE

Die Dilution-Rate einer Chemostatkultur ist identisch mit der steady-state Wachstumsrate der bakteriellen Population¹¹, zugleich variieren mit der D-Rate aber auch die physiologischen Bedingungen, unter denen die Mikroorganismen wachsen. So steigt der Anteil des Stoffumsatzes zur Erhaltung der Lebensfunktion der Zellen relativ zum Gesamtstoffumsatz mit abnehmenden D-Raten (Maintenance energy)^{2 6/2 7}. Zugleich verändert sich das Verhältnis von RNA zu DNA mit der D-Rate und schließlich bestimmt die D-Rate auch das verfügbare Reaktionspotential der Chemostatkultur^{2 8/2 9} etc.

Da diese Untersuchung relativ neu in unser Programm aufgenommen wurde, sollen zunächst Meßbeispiele für Pentachlorphenol gegenüber Chemostat-Kulturen von *Escherichia coli* die Bedeutung dieser Parametervariation für die toxikologische Bewertung demonstrieren (Abb. 8).

Die Aussagefähigkeit der Untersuchungen hängt im Wesentlichen auch von der Analyse von Biomasse-Konzentrationsdaten und daraus kalkulierten spezifischen Wachstumsraten als Funktion der Zeit nach Schadstoffzugabe ab, die Datenfülle ermöglicht hier jedoch nur einen schmalen Einblick, der am Beispiel von Intoxikationen von *E. coli* mit Hg^{II} für den energetischen Yield, wie er von Prochazka et al.³⁰ definiert wurde und dank des kalorimetrischen Monitorings in Verbindung mit Biomasse-Analysen auch als Funktion der Zeit darstellbar ist, gegeben wird (Abb. 9).

Das PCP-Beispiel zeigt, daß die entkoppelnde Wirkung bei sehr niedrigen D-Raten wesentlich stärker zum Vorschein tritt. Bei hohen D-Raten ergibt die kalorimetrische Messung keinen Response, Biomasse Daten demonstrieren jedoch einen vorübergehenden Einbruch in der Produktionsrate.

Die hohe PCP-Testkonzentration bewirkt bei allen drei D-Raten Hemmeffekte in der Wärmestrom-Zeit-Kurve, die deutlich über 50 % Hemmung hinausgehen. Die Kultur bei kleiner und mittlerer D-Rate verfügt jedoch nach Daigger & Grady²⁹ über ein ausreichendes Reaktionspotential, um den toxischen Effekt durch nachfolgende Überkompensation auszugleichen. Bei der hohen D-Rate, die etwa 87 % der maximalen Wachstumsrate entspricht, verfügt die Chemostat-Kultur nur über geringe Kapazität zur Wiedererholung; ein nahezu asymptotisches Wiedererreichen des ursprünglichen steady state resultiert. Weitergehende Datenanalyse unter Einbeziehung der Biomassedaten kann auch hier das Bild klären: nach sofortigem Zusammenbruch des Wachstums erreicht der energetische Yield zunächst Null, normalisiert sich in den drei Zeitreihen aber nach jeweils etwa zwei mittleren Verweilzeiten wieder auf den ursprünglichen Wert. Die spezifische Wachstumsrate strebt in allen drei Versuchen gegen den Maximalwert; dies führt als Konsequenz zu einer schnellen Wiederholung der Population, sofern die steady-state Wachstumsrate wesentlich kleiner ist, als die maximale spezifische Wachstumsrate.

Die zunehmende Intensität entkoppelnder Effekte durch Chemikalien mit abnehmender D-Rate der Testkulturen konnte für die Substanzen PCP, Phenol und 2-Nitrophenol demonstriert werden.

Im Falle von Hg^{II} Intoxikationen nimmt die inhibierend toxische Grenzkonzentration mit zunehmender D-Rate der Testkultur signifikant ab; zugleich nimmt die Dauer der toxischen Beeinflussung im Zeitmaß von mittleren Verweilzeiten (Abb. 9) zu. Die Beobachtungen deuten darauf, daß der dosisabhängige biologische Effekt von Hg^{II} in bakteriellen Chemostatkulturen bei geringen D-Raten möglicherweise durch enzymatische Adaptationen (Resynthese inaktivierter Enzyme) wirkungsvoller kompensiert werden kann, als bei hohen D-Raten.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die kalorimetrische Versuchsanordnung, die von uns entworfen und erprobt wurde, dürfte geeignet sein, toxikologische Kenndaten für Umweltchemikalien zu gewinnen, die den Standard-Testmethoden gleichwertig sind und eine weitere Kenngröße, die MEC, die auf testchemikalienbedingte Verschiebungen der energetischen Effizienz der Mikroorganismen schon unterhalb sonst nachweisbarer inhibierender Effekte hinweist.

Die kalorimetrische Registrierung der Aktivität von Chemostat-Kulturen zur Gewinnung der Standard-Toxizitäts-Kenndaten erfolgt selbsttätig und kann rechnergestützt in Zukunft sicherlich direkt bis zum transformierten und mit Kenndaten versehenen Wärmestrom-Zeit-Diagramm führen. Der experimentelle und vor allem der zeitliche Aufwand ist verglichen mit Screening Tests, wie von uns verwendeten Referenztests, recht hoch; der Aussagewert der MEC kann noch nicht in voller Breite abgeschätzt werden, scheint aber zumindest für Modellierungsversuche des Respons natürlicher Mikroorganismenpopulationen nötig.

Nach unseren Untersuchungen gewinnt die kalorimetrische Analyse toxischer Effekte mittels Chemostat-Kulturen eine neue Dimension von Aussagefähigkeit, wenn man die Wechselwirkung zwischen toxischem Effekt und steady-state Zustand der kontinuierlichen Kultur analysieren will und, wenn durch Hinzuziehung von Biomassemonitoring, daraus abgeleitet der spezifischen Wachstumsrate und der Biomasse Produktionsrate, und Monitoring der Energiesubstrat und Schadstoff-Konzentration Kenngrößen wie der energetische Yield in Bezug auf reale Schadstoffkonzentrationen bestimmt werden können.

FERNZIEL MODELLBILDUNG

Die vorgelegten Untersuchungsergebnisse machen deutlich, wie sehr toxikologische Studien auf Modellvorstellungen angewiesen sind (dies beginnt bereits mit Anpassungsmodellen zur Bestimmung der IC 50 Daten!). Ungleich

komplexer müssen Modelle sein, die toxische Effekte auf der Ebene von Populationen anhand weniger und leicht zugänglicher Toxizitätskennndaten beschreiben sollen. Hierzu erschien kürzlich ein umfassendes Papier zur Modellierung von Daphnien-Populationen³¹, das zeigt, wie bedeutsam eine differenzierte Betrachtung toxischer Effekte ist. Auch hinsichtlich der mikrobiellen Biozönose aquatischer Ökosysteme sind Modellbildungen, die nach unserer Einschätzung am ehesten für Stoff- und Energieflüsse zu realisieren sind, von Bedeutung und wir haben bereits Hypothesen mitgeteilt²², die von einer Monod'schen Modellierung des bakteriellen Wachstums ausgingen.

Zahlreiche Publikationen legen jedoch nahe, daß die Modellierung dynamischer Effekte in mikrobiellen Populationen weit über das Monod'sche Konzept, das auf steady-state Zustände in guter Aussagefähigkeit anwendbar ist, hinausgehen müssen^{32/33/29}.

Da wir selbst gerade mit dem Modellierungskonzept beginnen, wollen wir an dieser Stelle nur einen Modellvorschlag unterbreiten, der einige unserer Beobachtungen zusammenfaßt und auf dem Schema des mikrobiellen Metabolismus von Belaich²⁴ beruht (Abb. 10).

LITERATURLISTE

- 1) A.L. Buikema Jr., B.R. Niederlehner & J. Cairns Jr.:
Water Research, 16 (1982): pp. 239-262
- 2) OECD-Guideline for Testing chemicals; Summary of Considerations und Testmethoden zur Bestimmung der Toxizität 201, 202, 203 (1981)
Kontaktadresse: 2. Rue Andre-Pascal; 75775 Paris Cedex 16; Frankreich
- 3) G. Bringmann & R. Kühn: Zeitschrift für Wasser- und Abwasserforschung 10 (1977): pp. 87-98
- 4) N. Caspers & B. Hamburger: Z. Wasser- Abwasser- Forsch., 16 (1983): pp. 205-210
- 5) J. Cairns Jr.: Water Research, 15 (1981): pp. 941-952
- 6) Eugene P. Odum: Grundlagen der Ökologie; Bd. I: Grundlagen
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1983)
- 7) G.A. McFeters, P.J. Bond, S.B. Olson & Y.T. Tchan:
Water Research, 17 (1983): pp. 1757-1762
- 8) J.L. Slabbert & W.S.G. Morgan: Water Research, 16 (1982): pp. 517-523
- 9) C.I. Mayfield, D.W. Inniss & P. Sain: Water, Air, and Soil Pollution, 13 (1980): pp. 335-349
- 10) J. Monod: Annual Reviews Microbiology, 3 (1949): pp. 371-394
- 11) D. Herbert, R. Elsworth & R.C. Telling:
Journal of General Microbiology, 14 (1956): pp. 601-622
- 12) A.C.R. Dean, D.C. Ellwood, J. Melling & A. Robinson:
In: A.C.R. Dean, D.C. Ellwood, C.G.T. Evans & J. Melling (Hrsg.):
Continuous Culture 6; Applications and new Fields; Kapitel 19

Ellis Horwood LTD., Publisher, Chichester (1976): pp. 251-261

- 13) D. Schuller, J. Kahle, H. Riemann, P. Weppen & I. Wolke:
In: Journées de Calorimétrie et d'Analyse Thermique, Université de
Nancy I, 14.-15. Mai 1981; Association Française de Calorimétrie et
d'Analyse Thermique (Hrg.); Vol. XII, 18 pp. als Beilage
- 14) A.E. Beezer (Hrg.): Biological Microcalorimetry; Academic Press,
New York (1980)
- 15) J.M. Cardoso-Duarte, M.J. Marinho & N. van Uden: In: Siehe Referenz 12,
pp. 40-48
- 16) R. Brettel, I. Lamprecht & B. Schaarschmidt: European Journal of
Applied Microbiology and Biotechnology, 11 (1981): pp. 205-211
- 17) R. Brettel, I. Lamprecht & B. Schaarschmidt: European Journal of
Applied Microbiology and Biotechnology, 11 (1981): pp. 212-215
- 18) E. Marti, A. Geoffroy, J. Affolter & A. Kabay: In: E. Marti, H.R. Ostwald
& H.G. Widemann (Herg.): Angewandte chemische Thermodynamik und Thermo-
analytik; Experientia Supplementum, 37 (1979): pp. 184-199
- 19) S. Randzio & J. Suurkuusk: In: A.E. Beezer (Hrg.): Biological Microcalori-
metry; Academic Press, New York (1980): pp. 311-341
- 20) Kernforschungsanlage Jülich GmbH (Hrg.): 4. Projektbericht: Methoden zur
Bewertung von Chemikalien, (1982): pp. 5
- 21) P. Weppen & D. Schuller: Thermochimica Acta, 72 (1984): pp. 95-102
- 22) D. Schuller & P. Weppen: Calorimétrie et Analyse Thermique Journées de
la Gaillarde; Association Française de Calorimétrie et d'Analyse
Thermique (Hrg.); Vol. 14 (1983): pp. 264-266
- 23) R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman & R.Y. Stanier:
Journal of General Microbiology, 111 (1979): pp. 1-61
- 24) J.P. Belaich: In A.E. Beezer (Hrg.); Biological Microcalorimetry:
Academic Press, New York (1980): pp. 1-42
- 25) E.H. Battley: Physiologia Plantarum, 13 (1960): pp. 628-640
- 26) S.J. Pirt: Royal Society of London, Proceedings Series B,
Vol. 163 (1966): pp. 224-231
- 27) J. Fieschko & A.E. Humphrey: Biotechnol. Bioengineering, 26 (1984):
pp. 394-396
- 28) Q. Dortch, T.L. Roberts, J.R. Clayton Jr. & S.I. Ahmed:
Marine Ecology - Progress Series, 13 (1983): pp. 61-71
- 29) G.T. Daigger & C.P.L. Grady Jr.: Water Research, 16 (1982): pp. 365-382
- 30) G.J. Prochazka, W.J. Payne & W.R. Mayberry: J. Bacteriology, 104 (1970):
pp. 646-649
- 31) S.A.L.M. Kooijman & J.A.J. Metz: Ecotoxicology and Environmental Safety,
8 (1984): pp. 254-274
- 32) M. Chase: Biotechnology and Bioengineering, 19 (1977): pp. 1431-1447
- 33) L. Benefield & F. Molz: Biotechnology and Bioengineering, 26 (1984):
pp. 352-361

Abb. 1: Das Biokalorimeter

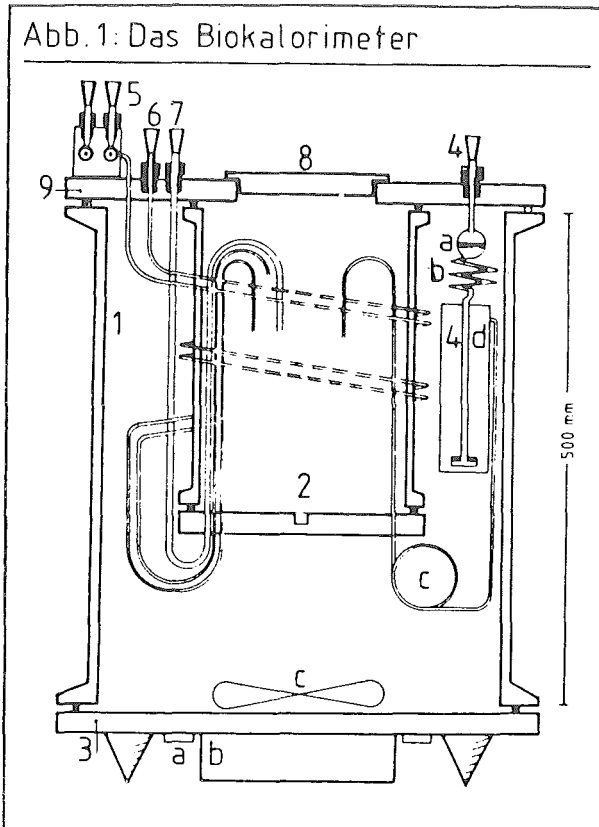


Abb. 3:

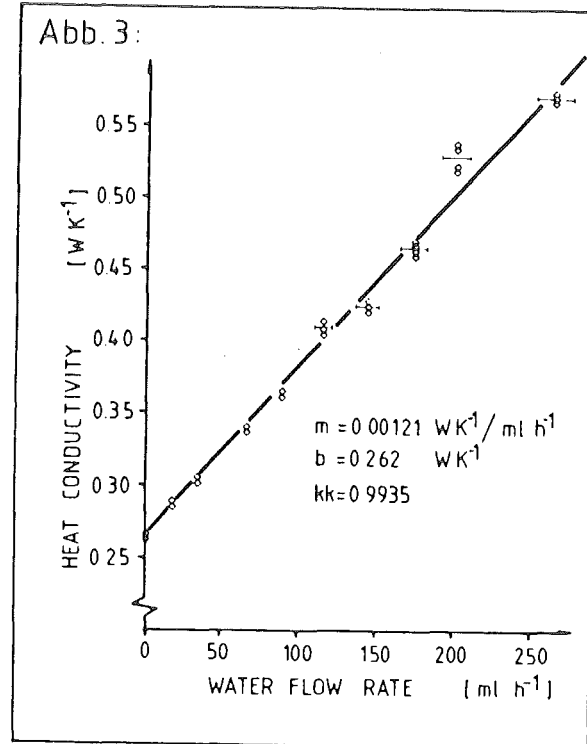


Abb. 1: Das Wärmeleitungs-Zwillings-Kalorimeter mit den Konstruktionselementen: Wasserbadthermostat (1); Meßzellen-Raum (2) ohne Meßzellen; Bodenbaugruppe (3) mit Heizelementen (a), Rührmotor (b), Rührwerk (c); Luftversorgung (4) mit Sterilfilter (a), Wärmetauschern (b,c), Gas-Waschflasche (d); Mediumzuführung (5) mit Teststoff-Injektorblock und Wärmetauschern; Inokulum Zuführung (6); Auslaß für Luft, Medium (7); Elektronik-Box (8). Die am Deckelteil (9) montierten Elemente können autoklaviert werden.

FIG. 2

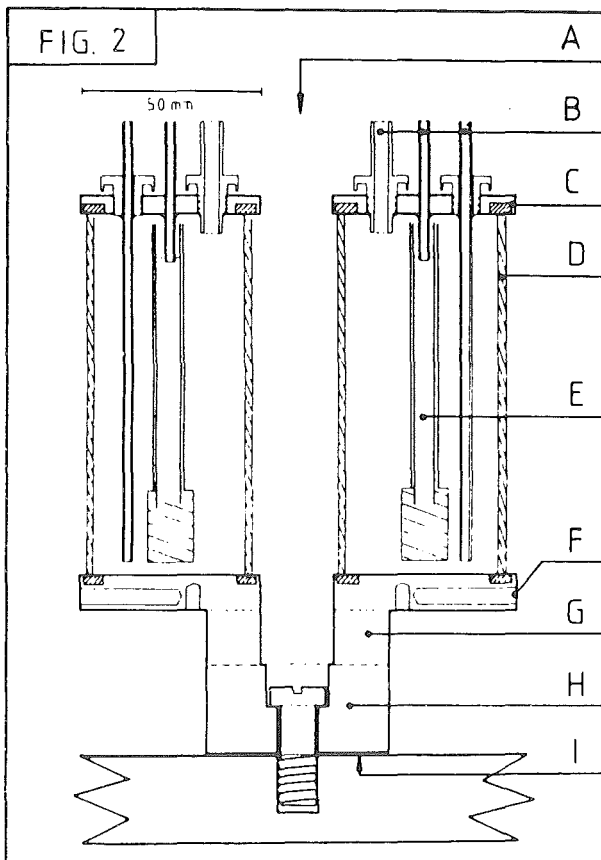


Abb. 2: Meßzellen (schematisch) mit Montagebereich für elektrische Versorgung (A); Medium Zufuhr, Luftversorgung und Auslaß (B); Deckelbaugruppe aus V4A Stahl (C); Glas-Zylinder (D); Gasverteilungsfritte (E); Boden-Baugruppe aus V4A Stahl mit Detektorpositionen (F); physikalisch definierte Wärmeleitstrecken (G); Montagesockel mit Thermostat-Referenzmeßstelle (H) und Kontaktfläche zum isothermen Thermostat (I).

Abb. 3: Der Wärmeleitwert zwischen Meßzelle und Thermostat als Funktion der Medium-Flow-Rate durch die Meßzellen. Der streng lineare Zusammenhang wird in die kalorimetrische Wärmeleitungsgleichung nach Tabelle 1 einbezogen. Theoretische Herleitung und Meßergebnis für die Wärmeleitung als Funktion der Medium-Flow-Rate differieren um weniger als 5 %.

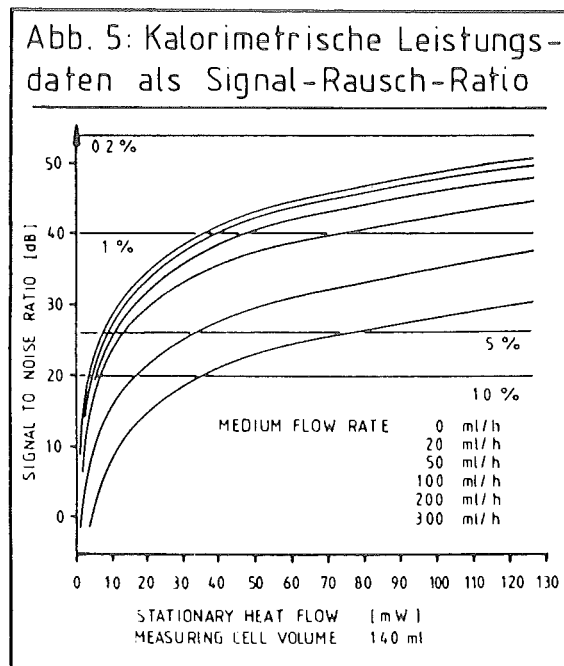
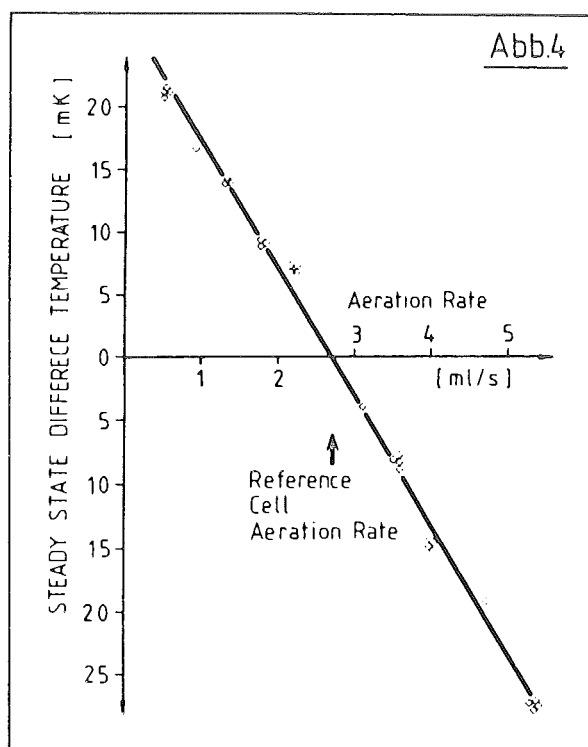


Abb. 4: Die Belüftung der kalorimetrischen Meßzellen verursacht thermische Effekte. So überlagern sich ein geringer exothermer Effekt infolge der mechanischen Rührleistung und ein größerer endothermer Effekt infolge der isothermen Dekompression eines Gases zu einer Verschiebung der kalorimetrischen Grundlinie, wie im Diagramm für stationäre Belüftungsraten dargestellt ist. Der Referenzwert wurde bei den Messungen konstant gehalten (0-Linien-Schnittpunkt).

Abb. 5: Das Signal-Rauschverhältnis charakterisiert das Signifikanzniveau kalorimetrischer Messungen von kurzzeitigen Wärmestromänderungen. Wärmestrom-Peaks werden als kalorimetrisch signifikant angesehen, wenn ihr Peak-Wert mindestens 2.6-fach über dem Rauschpegel liegt. Die Kurvenzüge resultieren aus Basislinien-Aufnahmen nach Anwendung der Tian-Transformation.

Abb. 6: Relative Wärmeproduktion von *Acinetobacter calcoaceticus* in Chemostat-Kultur bei halbmaximaler Wachstumsrate. Reaktion auf Zugaben von 2-Nitrophenol mit Anfangskonzentrationen von 1) 3,6 ppm; 2) 5,4 ppm; 3) 7,1 ppm; 4) 11 ppm; 5) 51 ppm; 6) 71 ppm. Gestrichelte Linien indizieren das Signifikanzniveau (bezogen auf die Chemostat-Kultur) und die Hemmeffekte.

Abb. 7: Die relative Wärmeproduktionsrate von *Acinetobacter* als Funktion der Schadstoffkonzentration. Die Konzentrationen sind logarithmisch skaliert.
■ $HgCl_2$, ▲ 2-Nitrophenol, ● 2,4-Dinitrophenol, □ Phenol.

Abb. 6:

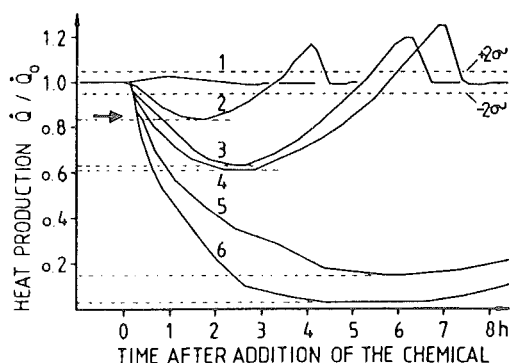
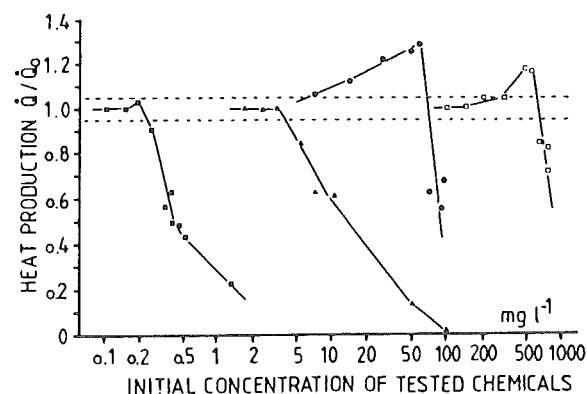


Abb. 7:



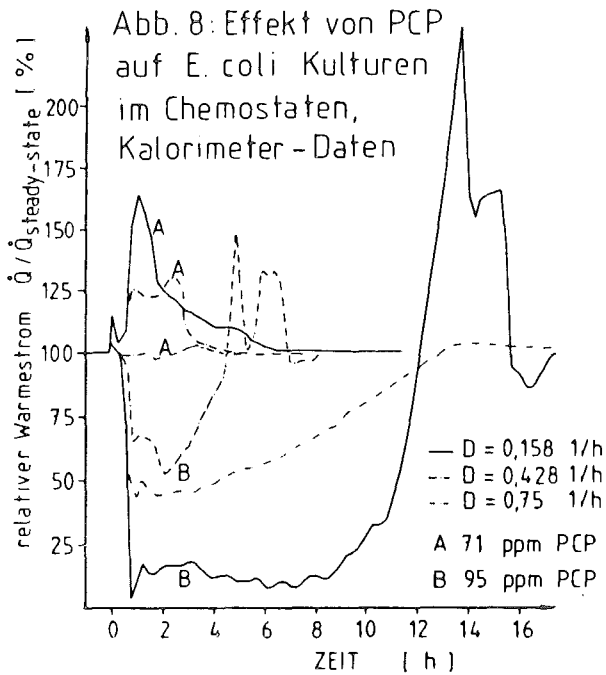


Abb. 9: Toxische Wirkung von HgCl_2 gegen E.coli Chemostat Kultur

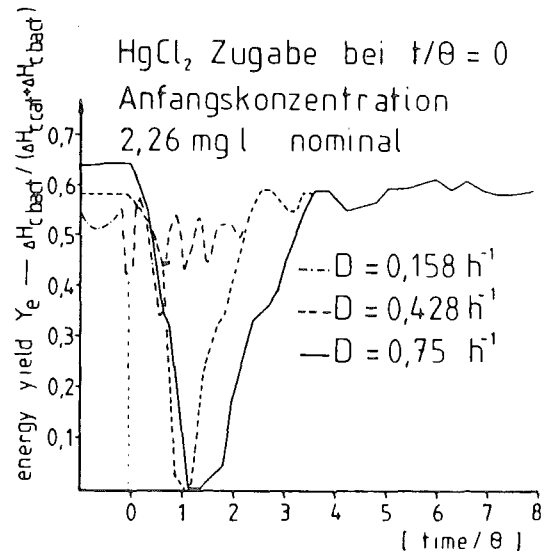
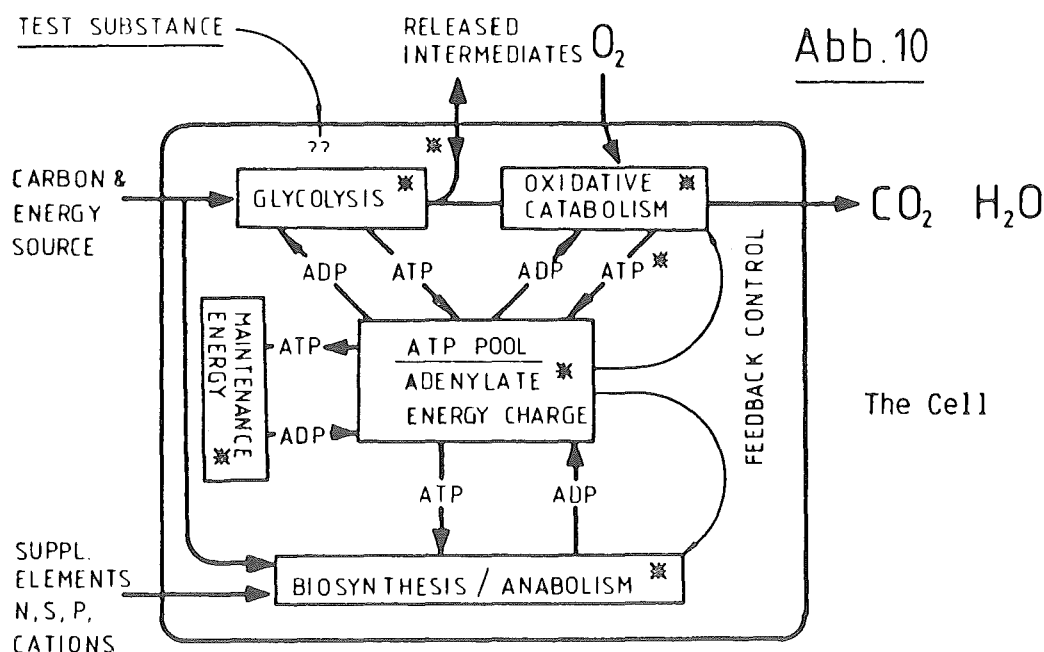


Abb. 8: Wirkung von PCP in Chemostat-Kulturen von Escherichia coli unter Wachstumslimitierung durch die Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose (2 mM). Angegebene Konzentrationen sind Nominalkonzentrationen für den Injektionszeitpunkt ($t=0$) der Batch-Dosierungen.

Abb. 9: Wirkung von HgCl_2 in Chemostat-Kulturen von Escherichia coli. Der energetische Yield ist eine kalkulierte Größe aus dem Biomasse-Standardbrennwert von 22.54 kJ/g, der Biomasse-syntheserate und den Wärmestromdaten. Die Toxizität von HgCl_2 nimmt im Modellbeispiel mit steigender D-Rate signifikant zu.

Abb. 10: Arbeitsmodell für toxische Effekte von Chemikalien gegenüber Mikroorganismen.
 * indizieren vermutete oder durch Messungen belegte Wechselwirkungen zwischen Teststoffen und Organismen. Der kalorimetrisch erfassbare katabolische Stoffumsatz resultiert aus der Verkettung der verschiedenen Kompartimente des Arbeitsmodelles.



Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (0372915)

Mikrokalorimetrische Verfahren zur ökotoxi-
kologischen Beurteilung von Umweltchemikalien

Teil II: Arbeiten zur Standardisierung und
Charakterisierung von kontinuierlich
gehaltenen Mischkulturen

von

Prof. Dr. Dieter Schuller

Dipl. Biol. Jochen Kahle

Arbeitsgruppe Ökochemie und Umweltanalytik
Fachbereich Chemie
Universität Oldenburg

August 1984

Mikrokalorimetrisches Verfahren zur ökotoxikologischen Beurteilung von Umweltchemikalien

Teil II: Arbeiten zur Standardisierung und Charakterisierung von kontinuierlich gehaltenen Mischkulturen

(Dieter Schuller, Jochen Kahle, AG Ökochemie und Umweltanalytik, Fachbereich Chemie)

Zusammenfassung: Die Bedingungen für die reproduzierbare Anzucht und Haltung bakteriell-protozoischer Mischkulturen unter fast beliebig variierbaren, physiologischen Kulturzuständen im Labor wurden ermittelt, die notwendigen Apparaturen entwickelt.

Die Charakterisierung und Untersuchung der Kulturen erfolgt einerseits über mikroskopische Beurteilung der Biozönose, andererseits über die Bestimmung chemischer Parameter, die den physiologischen Zustand der Kultur kennzeichnen. Reaktionskinetische Untersuchungen an den Kulturen basieren auf einem neu entwickelten Meßverfahren für einen Kurzzeit BSB, das sich durch besondere Zuverlässigkeit und Einfachheit auszeichnet.

Standardisation and characterisation of continous cultures of the sewage sludge type.

Abstract: Reproducible production and continous maintenance of mixed cultures of bacteria and protozoa is realized within widely variable physiological conditions, in a laboratory chemostat sytem, specially developed for this purpose.

The characterisation of the cultures is made as well by microscopical assessment of the cultures 'ecological state', as by determination of chemical parameters, describing the physiological state of the culture. Cinetical data, concerning the total-substrate-consumption reaction are based upon a short-time BOD, which has been developed.

MIKROKALORIMETRISCHE VERFAHREN ZUR ÖKOTOXIKOLOGISCHEN BEURTEILUNG VON UMWELT-CHEMIKALIEN

ARBEITEN MIT MISCHKULTUREN

Wenn hier von Mischkulturen die Rede ist, dann ist damit stets die komplexe Lebensgemeinschaft gemeint, die sich auf mikrobieller Ebene in β -mesosaproben Süßwassersystemen einstellt.

Um Untersuchungen an derartigen Systemen methodisch einwandfrei durchführen zu können, ist die Möglichkeit reproduzierbarer Anzucht der Testkulturen Voraussetzung. Es erweist sich auch als sehr gut möglich, Mischkulturen dieser Art auf der Basis eines vollsynthetischen Abwassers zu halten und, über die Substratkonzentration gesteuert, beinahe beliebige Systemzustände kontinuierlich zu realisieren.

Allerdings müssen diese Mischkulturen für die Erreichung stabiler Zustände mit Rückführung des "wash-out" gefahren werden, da andernfalls eine Verarmung der Kultur an höher organisierten Organismen (Protozoen, Metazoen), die eine längere Generationszeit haben, eintritt. Für kalorimetrische Untersuchungen stellt diese Notwendigkeit einer Schlammabscheidung und -Rückführung ein erhebliches Problem dar: im Schlammabscheider stellt sich notwendigerweise eine deutlich höhere Biomassekonzentration ein als im eigentlichen Reaktor. Eine kalorimetrische Untersuchung der Kultur im Reaktor kann deswegen auch nur einen (kleineren) Anteil der Gesamtreaktion erfassen, da die Einbeziehung des Schlammabscheiders in das Kalorimeter bisher nicht möglich ist.

Möglich wäre die kalorimetrische Untersuchung der Kultur im "batch"-Verfahren. Wegen der sich daraus ergebenden, völlig dem Konzept des Arbeitens mit der kontinuierlichen Kultur entgegenstehenden Testkonfiguration, wurde auf die kalorimetrische Untersuchung der Mischkultur verzichtet, zumal das Kalorimeter durch die Arbeiten an den bakteriellen Reinkulturen praktisch ständig belegt war.

Anstelle der kalorimetrischen Untersuchung wurden

- die mikroskopische Beurteilung der Kultur und
- ein respiratorischer Kurzzeittest

als Untersuchungsverfahren verfeinert, bzw. entwickelt.

Zusammen mit anderen Summenparametern liefert insbesondere der respiratorische Kurzzeittest die Möglichkeit, quantifizierte Aussagen zur Kinetik des Substratabbaus zu machen. Die mikroskopische Beurteilung und Dokumentation des Systemzustandes ist mit den kinetischen Daten korrelierbar, so daß eine quantifizier-

te Beschreibung des biozönotischen Zustandes möglich wird.

Die Kinetik des Substratabbaus ihrerseits reagiert auf Belastung des Systems - sei es mit Schadstoffen im engeren Sinn, sei es mit Konzentrationsveränderungen - rasch und reproduzierbar.

DIE BETRIEBSBEDINGUNGEN DER KONTINUIERLICHEN BELEBTSCHLAMMKULTUR

Die Kultur wird in einem zylindrischen, am unteren Ende über eine Fritte belüfteten Reaktor gehalten. Technisch ist der Reaktor als vollständig durchmischter 3-Phasen-Reaktor anzusprechen.

Der Reaktor endet am oberen Ende in einem Gasraum, der insbesondere bei evtl. auftretender Schaumbildung die mechanische Entschäumung ermöglicht.

Der Ablauf aus dem Reaktor erfolgt über ein Absetzbecken, in dem sich der Belebtschlamm aufgrund von Dichteunterschieden von der Überstandslösung trennt. Der Belebtschlamm wird - je nach Betriebsbedingung - zurückgeführt.

Die Rückführung erfolgt - wie auch die Substratversorgung - über Schlauchpumpen von unten in den Reaktor.

Die Temperatur des Reaktors wird über einen Doppelmantel konstant gehalten.

Die Betriebsbedingungen und Reaktordimensionen sind im Einzelnen in Anlage 1 dargestellt.

DAS SYNTHETISCHE ABWASSER

Vom synthetischen Abwasser ist zu fordern, daß eine auf ihm wachsende Belebtschlammbiozönose, sowohl hinsichtlich des Artengefüges und seiner Entwicklung, als auch in Bezug auf das makroskopische Verhalten vergleichbar ist mit einer unter sonst gleichen physikalisch-chemischen Reaktionsbedingungen aber auf Originalabwasser gewachsenen Belebtschlammbiozönose.

Einen Anhaltspunkt für die Zusammensetzung eines synthetischen Abwassers findet man in den OECD-Richtlinien¹. Das dort beschriebene synthetische Abwasser genügt aber nicht den oben angegebenen Kriterien: mikroskopisch entwickelt sich ein zwar reiches, aber von der typischen Belebtschlammbiozönose völlig abweichendes Artenspektrum. Makroskopisch fällt das völlig fehlende Absetzvermögen besonders auf.

Durch Zusatz von Spurenelementlösungen, sowie von Lösungen von Elementionen, die als Nebenbestandteile wichtig sind, konnte die OECD-Vorschrift für das synthetische Abwasser so modifiziert werden, daß mit dem Substrat das belebt-

schlammtypische Artenspektrum, seine Sukzession und auch die makroskopischen Eigenschaften des Belebtschlammes erreicht wurden. Die Verwendung des synthetischen Abwassers führt - unter sonst gleichen Kulturbedingungen im Mittelastbereich - zu einer gewissen Artenanreicherung gegenüber der auf Originalabwasser wachsenden Kultur: Es treten zusätzlich *Blepharisma*, *Chilodonella*, *Saprophilus* und *Cyclidium* auf.

Die Zusammensetzung des als synthetisches Abwasser verwendeten Substrats ist am Berichtsende beschrieben.

DIE TYPISCHE SUKZESSION DER PROTOZOENPOPULATION UND DIE FLOCKENENTWICKLUNG BEI ANWACHSEN AUS DER HOCHLAST. (SAUERSTOFFLIMITIERUNG)

Dieser Sukzessionsverlauf ist typisch für das Anwachsen der Belebtschlammbiozönose beim Animpfen eines synthetischen Abwassers (ca. 170mg KMnO_4 -CSB/l), aber auch für die Wiedererholung nach Zusammenbruch der Kultur wegen Überlast, wegen Sauerstoffdefizit oder nach Schädigung durch toxische Zusätze.

Unter Verweis auf den zweiten Zwischenbericht, wird die Sukzession hier nur in Form einer Tabelle beschrieben:

- 1) Bakteriensuspension
- 2) kleine Flocken
- 3) Flockenwachstum und Konturgewinn
- 4) Erste Protozoen: Amöben, Flagellaten
- 5) Erste polysaprobe Ciliaten: mobil lebende Ciliaten wie Colpidien
- 6) Ciliatenpopulation nimmt zu: polysaprobe sessile Ciliaten wie *Vorticella* mikrostoma
- 7) Erste α -mesosaprobe sessile Ciliaten, etwa *Opercularia*, *Vorticella*
- 8) Wachstum von z.B. *Opercularia*- und *Vorticella*populationen bzw. deren kolonien
- 9) Erstes Aufkommen von mobilen und sessilen Ciliaten höheren Sauerstoffanspruches wie *Vorticella convallaria*, *Vorticella campanula*, *Epistylis anastatica*, sessil: *Aspidisca*, *Chilodonella cucullulus*, mobil.
- 10) zeitgleiches Auftreten von Raubiciliaten wie *Lionotus fasciola*, mobil, *Podophrya fixa*, sessil.

Physikalisch-chemisch ist die mittellasttypische Klimaxgesellschaft durch eine Abbauleistung von 80%, bezogen auf KMnO_4 -CSB definiert.

DAS VERHALTEN DER BELEBTSCHLAMMBIOZÖNOSE IM HUNGERZUSTAND UND BEI WIEDERANFÜTTERN IM EXTREMEN SCHWACHLASTBETRIEB (SUBSTRATLIMITIERUNG)

Wird einer mittellasttypischen Klimaxgesellschaft, wie sie oben kurz beschrieben ist, die Substratzufuhr unter Weiterführung der Sauerstoffversorgung entzogen, so erfolgt eine Entwicklung zu einem Hungerzustand, der biozönotisch folgendermaßen beschrieben werden kann: (siehe auch Anlage 2)

Nach Veratmung der Restkonzentration nach Abschalten der Substratzufuhr sind erste Reaktionen auf der makroskopischen Seite des Systems kurzfristiger Verlust der Absetzfähigkeit und Schaumbildung.

Mikroskopisch stellt sich ein Flockenzerfall ohne starke Zunahme an suspendierten Bakterien ein.

Auf protozoischer Ebene finden sich in der Anfangsphase zunächst bei den Peritrichen typische Defizitreaktionen, dem Sauerstoffdefizit ähnlich, jedoch ohne Korpusblähung.

Kurzfristige Schwärmerbildungen bei Koloniebildnern sind festzustellen.

Die Schwärmer sind innerhalb 1 Verweilzeit wieder verschwunden.

Anschließend erfolgt sehr schnell die Entzystierung, zunächst am Stiel verbleibend, dann vom Stiel getrennt.

Die Zysten liegen dann als kugelige Strukturen, die nicht mehr artlich identifizierbar sind, vor.

Makroskopisch nimmt zu diesem Zeitpunkt (nach ca. 3 Verweilzeiten) das Absetzvermögen wieder stark zu.

Jetzt setzt langsam Algenwachstum zunächst an der Phasengrenze, mikroskopisch dann in der gesamten Flüssigkeitssäule ein.

Nach einer Verödung bei den Protozoen als Übergangsphase sind dann ab ca. der 10. bis 12. Verweilzeit sehr vereinzelt Rotatorien, Oxytricha- und Hemiophrysoformen anzutreffen.

Zusammengefaßt ist die Entwicklung der Kultur vom Klimax- in den Hungerzustand durch Artenverarmung, nicht totale Verödung, auf protozoischer Ebene, Größenabnahme der Flocke, Zunahme von coccoiden Algen und Diatomeen gekennzeichnet.

Damit ist der Verharrungsstatus der Kultur erreicht.

Der "Rückweg" durch Wiederaanfüttern ergibt dann eine Sukzession, die bei den sessilen, sauerstoffdefizitsensiblen Peritrichen beginnt.

Das ist der Fall, wenn man substratlimitierend beginnt, die Kultur 'einzuarbeiten'. Die Verkürzung der Zeit bis zum Erreichen der schwachlasttypischen Klimaxgesellschaft erklärt sich aus dem Fehlen des 'sauerstofflimitierenden Berges' bei substratlimitierter Betriebsweise.

UNTERSUCHUNGEN ZUR REAKTIONSKINETIK DER ZEHRUNGSREAKTION DER MISCHKULTUR

Die biozoenotische Aktivität einer Mischkultur kann - bei Anwendung bestimmter Vereinfachungen - versuchsweise über ein kinetisches Modell für die Zehrungsreaktion beschrieben werden. Dabei wird vereinfachend angenommen, daß ein als uniform angenommenes Substrat durch die Biozoonose, die als einheitlicher 'Biokatalysator' aufgefaßt wird, unter Sauerstoffverbrauch metabolisiert wird. Auf ein derartiges System kann die Modellvorstellung angewandt werden, die Briggs und Haldane² in Erweiterung der Michaelis-Menten-Theorie der Enzymkinetik entwickelt haben. Die Kinetik der Reaktion wird durch Art und Konzentration des Substrats, durch die verfügbare Sauerstoffmenge und vor allem auch durch die Wirksamkeit des Biokatalysators bestimmt. Eine Ermittlung der reaktionskinetischen Daten für die Zehrungsreaktion unter definierten Bedingungen der Sauerstoff- und Substratversorgung, läßt somit auch Rückschlüsse auf die Wirksamkeit des Biokatalysators zu.

Zugang zu den notwendigen Bestimmungsgrößen für die Kinetik der Zehrungsreaktion bietet die Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Sauerstoffzehrung durch die Mischkultur. Es wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffzehrung sehr rasch, mit hoher Reproduzierbarkeit und ohne Probenverlust zu messen (Clark-Elektrode, schreiberregistrierte Sauerstoffverlaufskurve). Die Auswertung der Kurve ermöglicht die Bestimmung von Reaktionsordnung, Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, Anfangsgeschwindigkeit v_0 und Maximalgeschwindigkeit v_{\max} der Gesamtreaktion. Auf diese Weise wird auch die Überprüfung der aus dem Briggs-Haldane Modell hergeleiteten Zeit-Zehrungskurve sehr viel einfacher möglich, als dies bisher der Fall war³.

Von besonderem Interesse ist die Möglichkeit, eine auf diese Weise über die Ermittlung kinetischer Daten 'gemessene Wirksamkeit des Biokatalysators' mit den Ergebnissen der mikroskopischen Beurteilung der Biozoonose zu vergleichen.

Die Auswertung der Messungen erfolgt nach den bekannten Verfahren der chemischen Reaktionskinetik. Bei der komplex zusammengesetzten Reaktion treten allerdings fast stets gebrochene Reaktionsordnungen auf. Ein Beispiel für die Ermittlung der Ordnung der Zehrungsreaktion einer sauerstofflimitiert auf synthetischem Abwasser gehaltenen Mischkultur ist im Anhang gegeben.

VERSUCHE ZUR ADAPTIERUNG DER KULTUR AN PCP

Mit der Erfahrung des Kulturverhaltens unter Verwendung des entwickelten funktionstüchtigen synthetischen Abwassers wurden Wirkung, Anpassung und mögliche Metabolisierung von Pentachlorophenol durch die Mischkultur untersucht.

Dazu ist notwendigerweise die Wirkungsweise einer subletalen Konzentration zu testen.

Subletal bedeutet im Umgang mit PCP, eine sehr niedrige Konzentration zu wählen. (Vergleiche Ergebnisse des Teilberichtes I)

Verwendet wurde eine Substratlösung mit 150 ppb PCP, die durch eine Mischapparatur unmittelbar vor dem Reaktor aus dem oben beschriebenen synthetischen Abwasser und einer PCP-Stammlösung kontinuierlich hergestellt wird. Mit Kenntnis des prinzipiellen Verlaufes von Zusammenbruch und Wiedererholung der Mikrobiozönose wurde zunächst als Beurteilungskriterium der Adaption die wieder erreichte Klimax- mittellasttypische protozoische Artenvielfalt festgelegt.

DIE WIRKUNG VON PCP AUF DIE BIOZÖNOSE - EINE QUALITATIVE BEOBACHTUNG

In Konsequenz zur bisher betriebenen mikroskopisch-ökologischen Untersuchungsstrategie - biozönotische Reaktionsmusterermittlung und anschließende Quantifizierung - wurde die Wirkung von PCP auf das makroskopische Bild und mikroskopisch auf das Artengefüge untersucht.

Hierbei konnte festgestellt werden:

Erste Reaktionen erfolgten nicht auf protozoischer Ebene, sondern bei der Flocke.

Hierauf reagierte, erwartungsgemäß, die Fraktion der sessilen Ciliaten, die Peritrichen, zunächst mit deutlich erkennbarem Aktivitätsschwund - Cilien-schlagaktivitätsabnahme. Nach völligem Einstellen dieser Nahrungserwerbstätigkeit erfolgte die Schutzhüllenbildung, nachdem das Zooid eine für Sauerstoffdefizit typische kurzfristige Blähung des Korpus vollzog.

Heftige Kontraktionen der Stiele bei den Vorticellen begleiteten o.g. Vorgang. Kurz vorher (ca. eine Verweilzeit) und zeitgleich damit verlor die Flocke an Kontur, typischerweise verbunden mit trübungserzeugender Zunahme an suspendierten ehemals flockenfixierten Bakterien.

Ebenfalls synchron zur Schutzhüllenbildung auf der Seite der sessilen Ciliaten konnte ein drastischer Schwund des Raubciliatenbestandes festgestellt werden,

(innerhalb einer Verweilzeit $\hat{=}$ 8 Stunden).

In der Fraktion des bakterienfressenden mobilen Ciliatenbestandes konnte zunächst keine Abweichung vom normalen Verhalten beobachtet werden, jedoch war nach 21 Verweilzeiten, entsprechend 7 Tagen, die Biozönose auf der Ebene der Protozoen verödet. Siehe Anlage 3.

Die Flocken selbst zeigten eine Auflösungserscheinungsform, wie sie bisher nicht beobachtet worden war: es war weniger ein Größenverlust, als vielmehr ein Dichteverlust zu verzeichnen. Es zeigte sich eine dendritenähnliche nyaline Flockenperipherie, die einzelne Bakterien erkennen ließ. Schließlich kam diese Erscheinung allgemein so stark zum Tragen, daß ganze Flocken so ausdünneten. Siehe Anlage 3. Makroskopische Störindikationen: Farbänderung zu hellorange, völlig fehlendes Absetzvermögen und fehlende Eliminationsleistung. In diesem Zustand verharrte die Kultur in einem Zeitraum von 3 Monaten, ehe die typische Wiedererholungssukzession über erste mobile Protozoenformen (Amöben, Flagellaten), über mobile zu sessilen Ciliaten wechselte und das sukzessionstypische Koloniewachstum wieder einsetzte.

Die Klimax schließlich konnte auch phys.-chemisch gemessen bis zur Nitrifikationsbiozönose nachgewiesen werden im 4 Monat.

ZUSAMMENSETZUNG DES SYNTHETISCHEN ABWASSERS

Hauptbestandteile	Nebenbestandteile	Spurenelemente
5,12 g Pepton aus Fleisch	100 ml Stammlösung I	20 ml Spurenelement-
3,25 g Fleischextrakt	10 ml Stammlösung II	lösung I
0,96 g Harnstoff	50 ml Stammlösung III	20 ml Spurenelement-
		lösung II

Aufgefüllt mit Leitungswasser auf 32,0 kg Lösung

Stammlösung I: 2,24 g NaCl + 1,28 g CaCl₂ · 2 H₂O in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.

Stammlösung II: 6,40 g MgSO₄ · 7 H₂O in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.

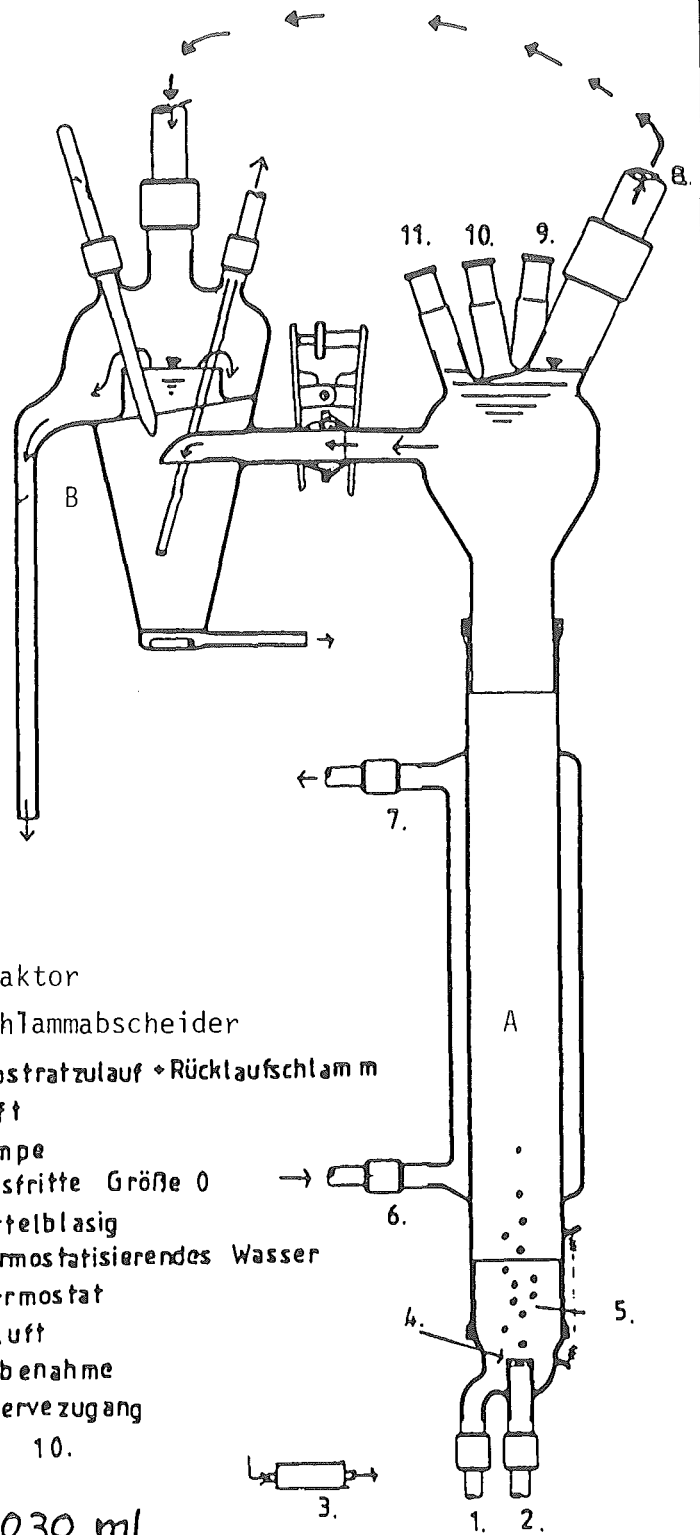
Stammlösung III: 7,00 g FeCl₃ · 6 H₂O in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.

Spurenelementlösung I: Spurenelementlösung nach STANIER

Spurenelementlösung II: 6 g Zitronensäure, 6 g Eisenammoniumcitrat und 1 g Dinatrium-Magnesium-EDTA in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.

Anlage 1

Vollständig durchmischter 3-Phasen-Reaktor für die kontinuierliche Haltung von mikrobiellen Mischkulturen



Volumen : 1030 ml

Luft : $412 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

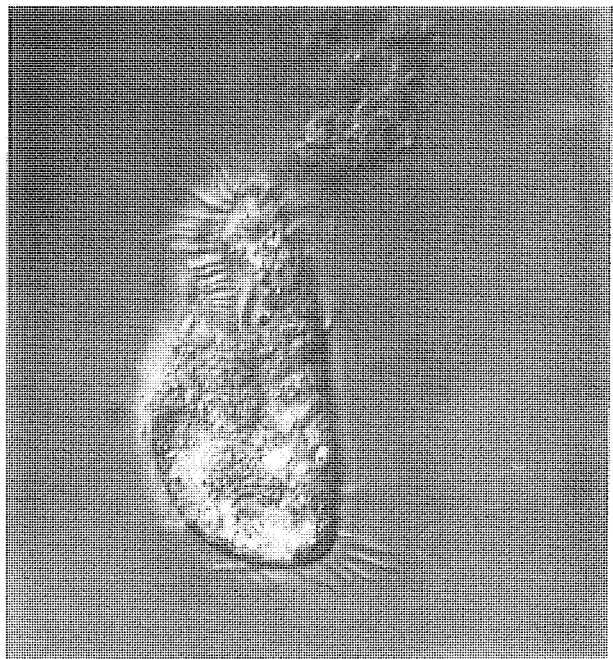
Substrat : $2,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ feststofffrei

Schlammrücklauf : $19,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

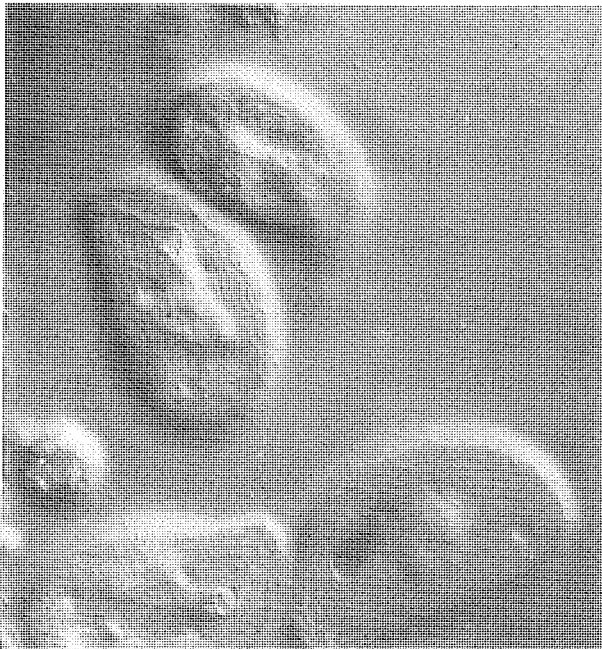
Anlage 2



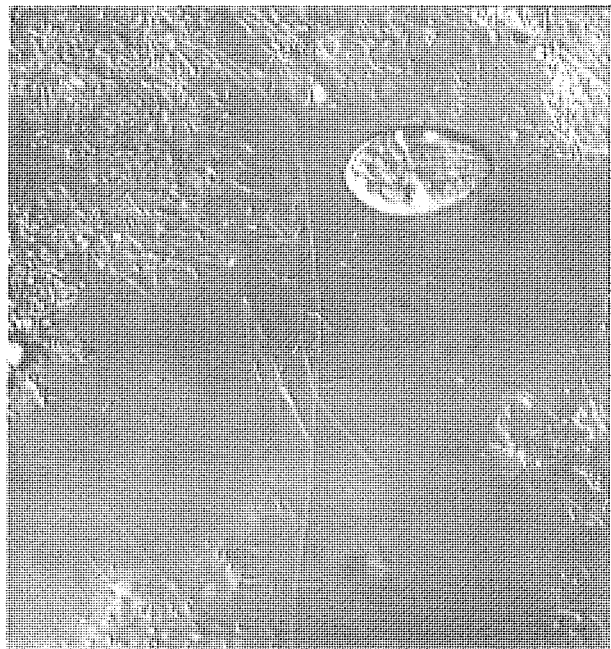
Cyclidium citrullus, α -mesosaprob,
synthetisches Abwasser



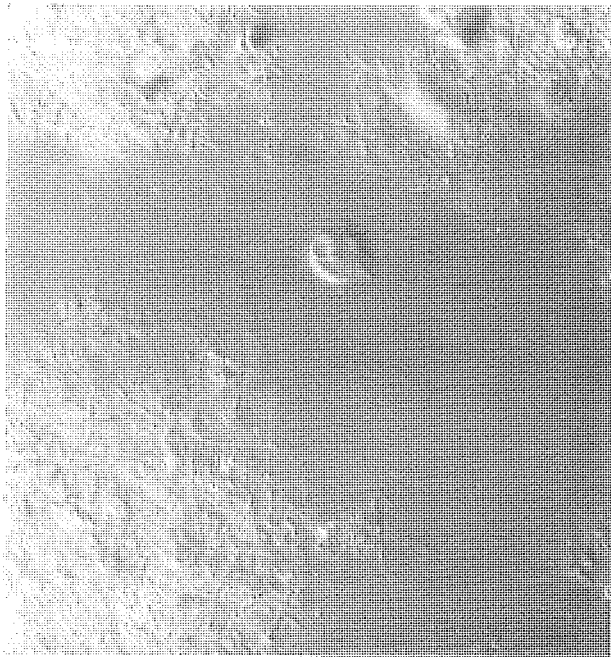
Oxytricha saprobia, α -mesosaprob,
synthetisches Abwasser



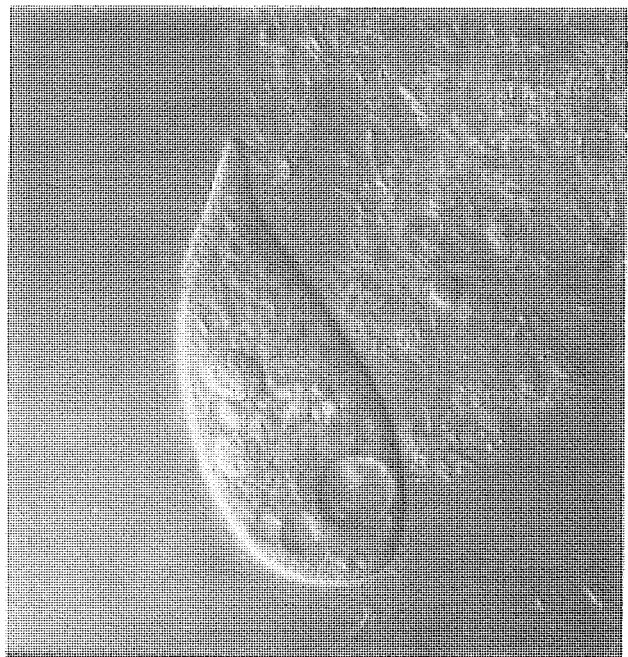
Chilodonella cucullulus, α - β -meso-
saprob; synthetisches Abwasser



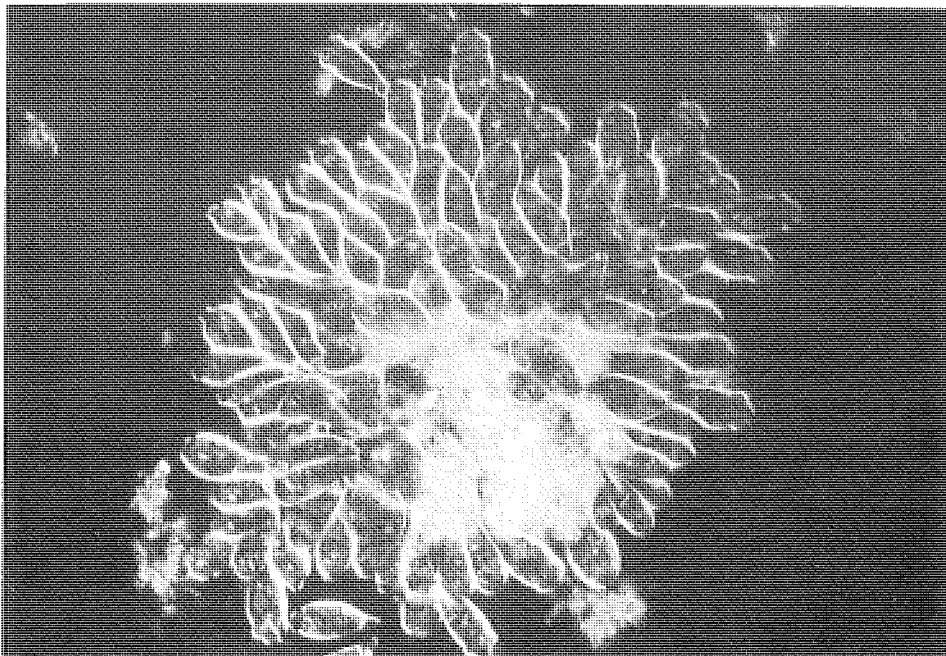
Saprophilus putrinus; Sukzessions-
pionier; 'monobakterielle Flocken-
peripherie; synthetisches Abwasser



Flockenwachstum; erste Strukturierung
zu Sukzessionsbeginn; typisches Be-
gleitzoid: *Vahlkampfia vahlkampfii*;
synthetisches Abwasser

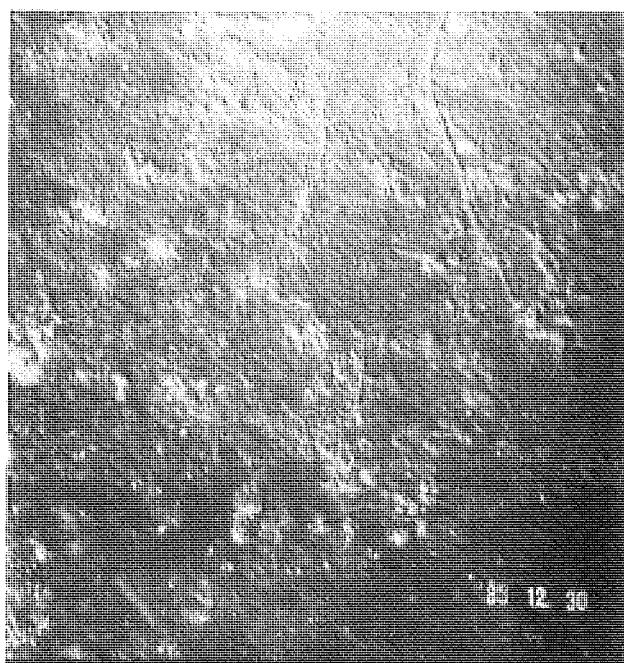
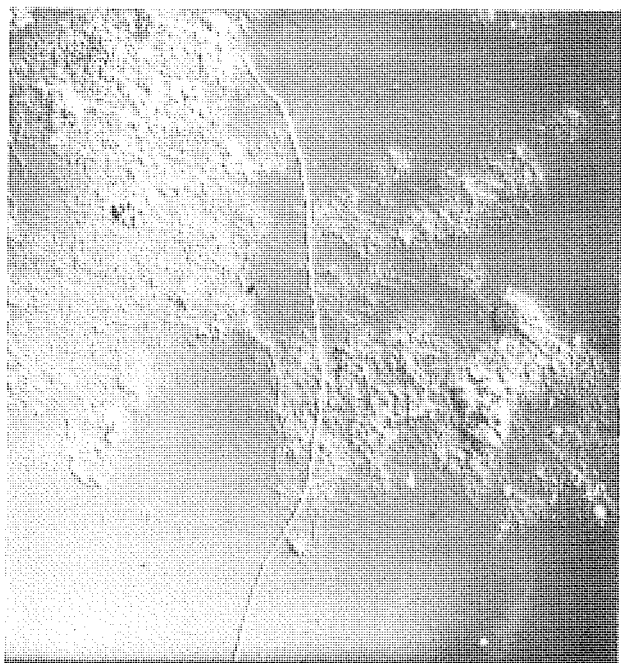


Blepharisma lateritium; Ciliat der
Übergangsphase; tritt nur dort auf;
synthetisches Abwasser

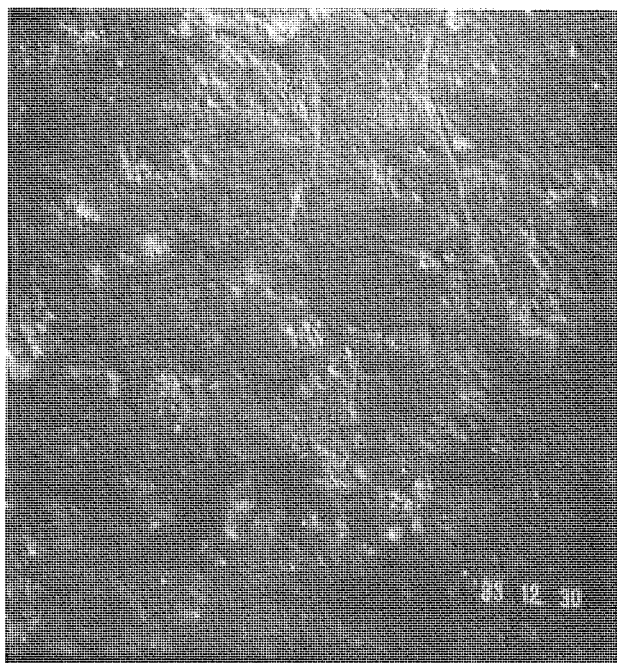


Epistylis anastatica; Pionierciliat 'auf dem Rückweg': Hungerzustand → Sub-
stratlimitierung → Sauerstofflimitierung

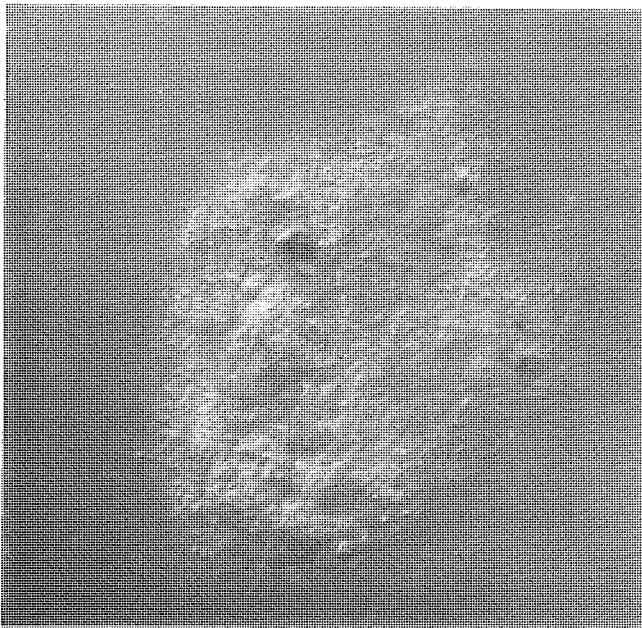
Anlage 3



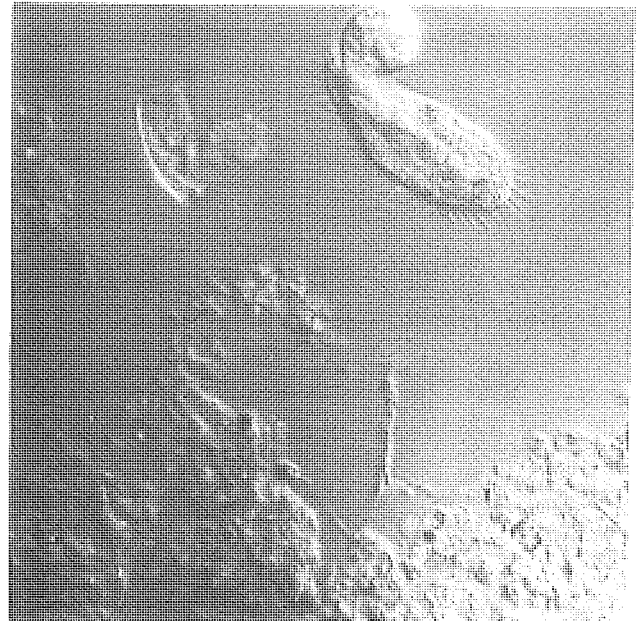
PCP-induzierte protozoische Verödung einer sauerstofflimitierend gehaltenen Mischkultur; synthetisches Abwasser



PCP- induzierter Dichteverlust der Flocke einer sauerstofflimitierend gehaltenen Mischkultur; synthetisches Abwasser



Wiedererholung (PCP-adaptiert)
Kontur- und Dichtegewinn der
Flocke



Wiedererholung (PCP-adaptiert); Raub-
ciliat, beutenehmend; repräsentativ
für Klimax

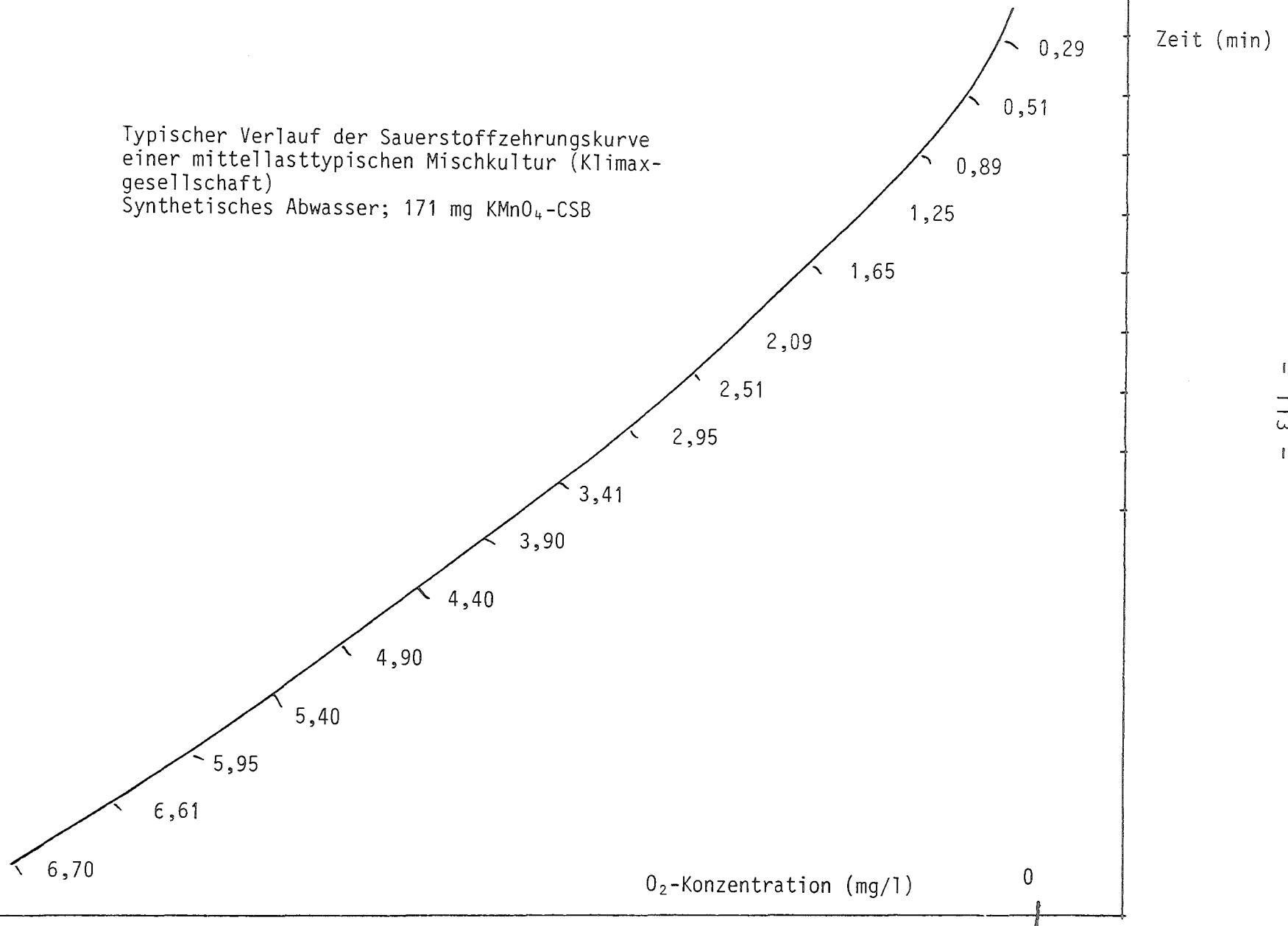
Anlage 4

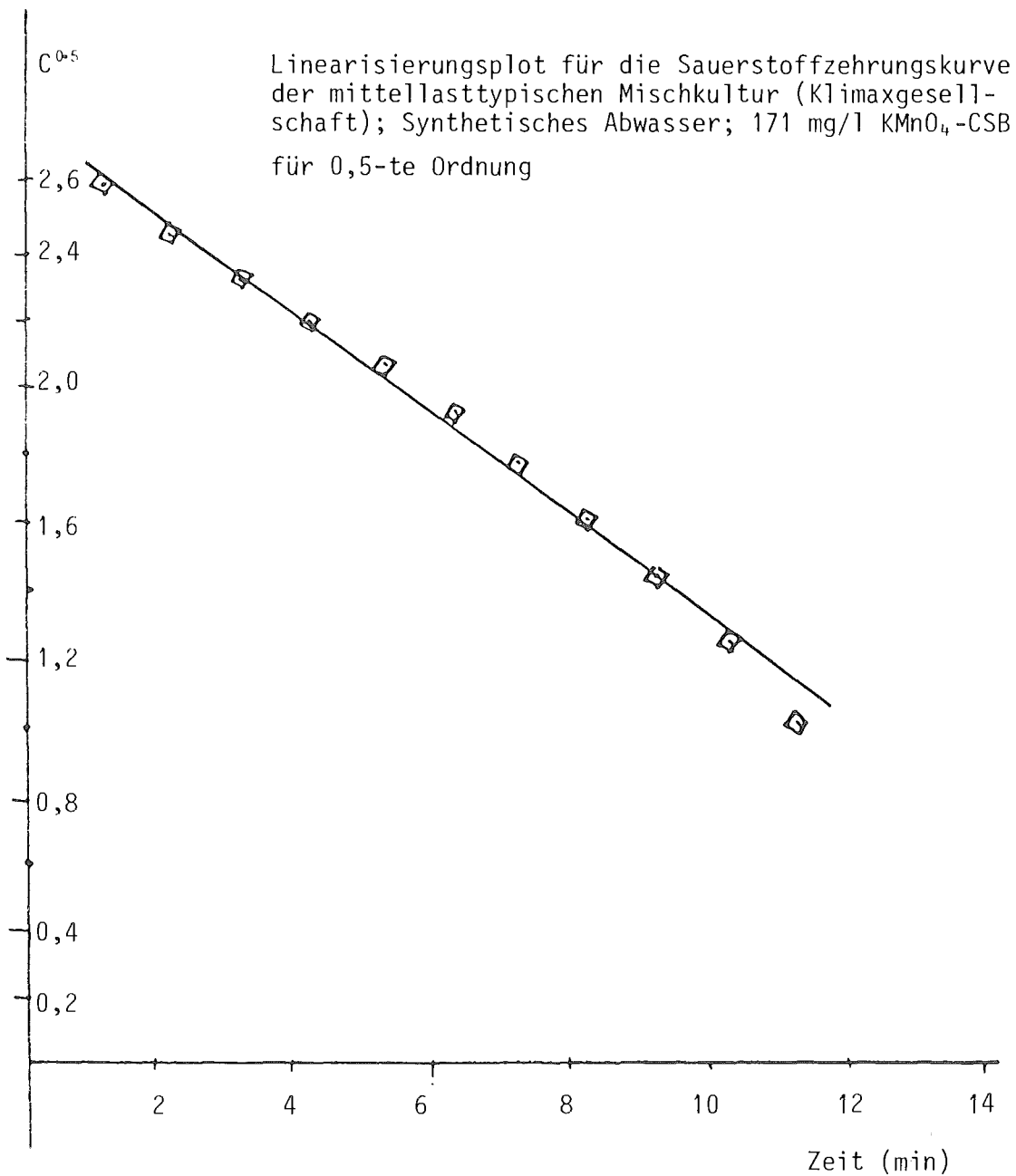
Beispiel für die Ermittlung der Ordnung der Zehrungsreaktion einer sauerstofflimitiert auf synthetischem Abwasser gehaltenen, im mittellasttypischen Klimaxzustand befindlichen Mischkultur.

Meßzeit min	O ₂ -Konzentration mg/l	Linearisierungsansatz für	
		1. Ordnung: $\ln C_0/C$	0,5-te Ordnung: $C^{0.5}$
0	6,7	0,013	2,588
1	6,61	0,094	2,570
2	5,95	0,119	2,439
3	5,4	0,216	2,324
4	4,9	0,313	2,214
5	4,4	0,421	2,098
6	3,9	0,541 *	1,975
7	3,41	0,675 *	1,847
8	2,95	0,820 *	1,717
9	2,51	0,981 *	1,584 *
10	2,09	1,165 *	1,446 *
11	1,65	-1,40 *	1,28 *

Die durch * gekennzeichneten Werte liegen bereits klar außerhalb des linearen Bereichs.

Typischer Verlauf der Sauerstoffzehrungskurve
einer mittellasttypischen Mischkultur (Klimax-
gesellschaft)
Synthetisches Abwasser; 171 mg KMnO_4 -CSB





ZITIERTER LITERATUR

- 1 OECD-Guidelines for Testing of Chemicals; Section 3; Degradation and Accumulation; Simulation Test - Aerobic Sewage Treatment: Coupled Units Test; 303 A, Page 6.
- 2) Briggs und Haldane, 'Kinetics of Enzyme Action'; J. Biochem. 19,(1925), 338.
- 3 Wilderer, P.; 'Die Enzymkinetik als Grundlage der BSB-Reaktion' Dissertation, Karlsruhe, 1969

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (O3 7201, O3 7268)

Standardisierter Mikroaufwuchs als Testobjekt
für ökochemische Faktoren im Wasser

von

Dipl.Biol. Heinz-Dieter Reinhardt

und

Dr. Diedrich Backhaus

Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg
Institut für Wasser- und Abfallwirtschaft
Karlsruhe

Institutsleiter:

Direktor Dipl.-Ing. Pippart

September 1983

Zusammenfassung

Es wird die Eignung eines neuartigen Aufwuchssammlers für ökologische Schadstofftests untersucht, der unter teilstandardisierten Bedingungen (Dauerlicht, Strömung = 65 cm/s) einen naturnahen, homogenen Bewuchs in einem durchströmten Zylindergefäß erzeugt. Die Schadstoffeffekte werden durch Ermittlung der Parameter Chlorophyll a-Gehalt, O_2 -Produktionspotential, Protein-Gehalt, ATP, Dehydrogenasen-Aktivität, aschefreies Trockengewicht und durch mikroskopische Bewuchsanalyse wiedergegeben. Grünalgen zeigen sich in den meisten Tests empfindlicher als Diatomeen und diese wiederum empfindlicher als die heterotrophen Mikrophyten wie Bakterien und Pilze. Mit zunehmender Schadstoffkonzentration wird der Bewuchs mehr und mehr von heterotrophen Organismen dominiert, bzw. die gesamte Biomasse geht stark zurück (Hg). Erwartete Unterschiede zwischen Tests mit denselben Schadstoffen am Rhein und am Buschbach (unbelastetes Gewässer) bleiben gering. Die im Test verwendeten Schadstoffe lassen sich zu folgender Reihe anordnen, gegenüber der die Aufwuchsbiocoenen mit abnehmender Empfindlichkeit reagieren:

Hg - Trichloräthylen - Anilin - Pentachlorphenol - Dodecylsulfat - 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure - Methanol.

Summary

The subject of this investigation is the development of a new periphyton-sampling device and its use in ecotoxicity-tests. Streamwater flowing through this sampler generates a naturlike aufwuchs community of great homogeneity on the transparent foil used as substrate and under reproducible light and flow conditions. The effects of toxic substances are detected as deviations from controls using parameters as chlorophyll a-content, O_2 -production, protein-content, dehydrogenase-activity, ash-free dry-weight and community structure. Green algae proved more sensitive to the toxic substances tested than diatoms and diatoms more than heterotrophic microphyta as bacteria or fungi. In most of the tests an increase of heterotrophes with increasing toxic concentrations was observed which was sometimes accompanied with a decrease of total biomass (Hg). Expected differences between test-sites on the River Rhine (polluted) and Buschbach (unpolluted creek) were not significant. Following sequence of decreasing effects on Aufwuchs was found:

Hg - trichlorethylene - aniline - pentachlorophenol - dodecylsulfate - 2,4 dichlorophenoxyacetat - methanol.

1. Einführung

Das hier vorgestellte Untersuchungskonzept verfolgt das Ziel, die rasche Anpassungsfähigkeit des biologischen Aufwuchsrasens, insbesondere seiner Periphytonkomponente, an wechselnde ökologische Verhältnisse für die Entwicklung eines Toxizitätstestverfahrens nutzbar zu machen. Mit der Einbeziehung einer ganzen Ökosystemkomponente in das Testsystem wird das bisher dominierende, in vielerlei Hinsicht aber unbefriedigende Verfahren der Verwendung einzelner Organismen oder Arten für Ökotests verlassen. Statt dessen kann direkt auf die Ebene eines biocoenotischen Tests übergegangen werden. Die nächsthöhere Stufe der Testausführung, die Einbeziehung ganzer Ökosysteme in das Testgeschehen z.B. in Form kleiner Teichanlagen (DORTLAND 1980, HANSEN lfd. BMFT-Proj., HUBER lfd. BMFT-Proj.), erweitert zwar die Aussagemöglichkeit, besitzt aber den Nachteil sehr langgezogener Versuchsabläufe.

Mit dem Mikroaufwuchs-Testverfahren kann unmittelbar am Gewässer gearbeitet werden. Es verwendet nur solche Biocoenosen, die das Gewässer selbst bereitstellt. Dadurch entfallen all jene Willkürlichkeiten, die der künstlichen Einrichtung von Modellökosystemen anhaften.

Die im Folgenden ermittelten Ergebnisse stellen vorerst Resultate von Messungen dar, die auf die prinzipielle Funktionstüchtigkeit der Testapparate und die Empfindlichkeit des Systems abzielen.

2. Material und Methoden

2.1 Testanordnung

Das Kernstück der Testeinrichtung besteht aus einem Glaszylindergefäß von 1 l Inhalt, das in vertikaler Richtung von herangepumptem Flußwasser durchströmt wird (Abb. 1).

Zur Vermeidung langer Fließwege ist eine Aufstellung möglichst in Ufernähe anzustreben. Das eintretende Wasser wird mit Hilfe eines Rührpaddels auf eine konstante Randgeschwindigkeit von 65 cm/s gebracht. Es läßt aus der mitgebrachten Organismenfracht im Wandbereich ein dünnes gleichmäßiges, in Parallelansätzen weitgehend reproduzierbares Aufwuchslager entstehen. Eine Ringleuchte sorgt für konstante Beleuchtung. Fremdlicht wird durch eine dichtschießende

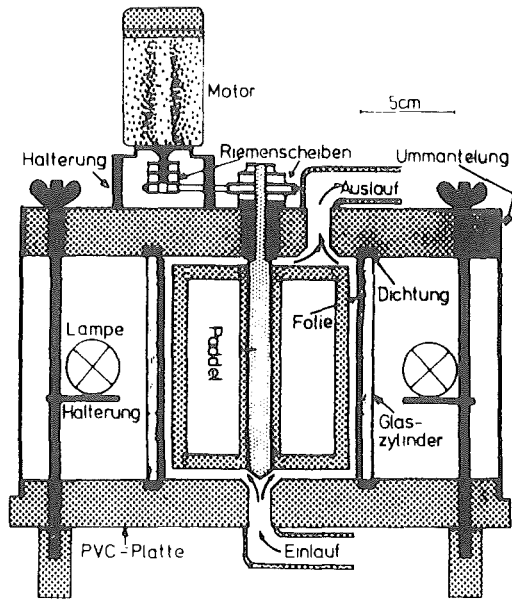


Abb. 1 Seitenriss durch einen Aufwuchssammler.

Ringmanschette abgeschirmt. Um das Aufwuchsmaterial nach Versuchsende unbeschädigt dem Gefäß entnehmen zu können, ist die Innenwand des Zylinders mit einer dünnen, elastischen und chemisch-inerten Klarsichtfolie (Hostaphan), dem Aufwuchsträger, ausgekleidet. Temperatur, Chemismus und Organismenfracht folgen den natürlichen Gegebenheiten des Gewässers. Orientierende Vorversuche konnten zeigen, daß es für die Aufwuchsentwicklung

unerheblich ist, ob das Substrat in das Gewässer gebracht oder das Wasser an das Substrat herangeführt wird.

Der zu testende Stoff wird dem zufließenden Wasserstrom vor Eintritt in das Testgefäß per Injektion mittels Dosierpumpe direkt appliziert (Abb. 2). Die einzugebende Menge zur Erzielung der gewünschten Endkonzentration im Testgefäß wird unter Berücksichtigung von Pumpenstrom und Konzentration der Stammlösung rechnerisch ermittelt (Aufwandmenge). Für die Durchführung eines Testablaufes ist eine Bewuchsdauer von 3-4 Wochen erforderlich, weil sich erst in dieser Zeitspanne eine fertige Biocoenose einstellt (BACKHAUS, 1967).

Nach dem Abschalten der Wasserzufuhr ist zur Vermeidung physiologischer Schädigungen (Chlorophyllinaktivierung!) das Aufwuchsmaterial sehr schnell den Untersuchungsprozeduren zuzuführen.

Sofern der zu testende Stoff (z.B. kostenbedingt) nicht in großen Mengen zu Verfügung steht, kann der Test im intermittierenden Betrieb durchgeführt werden. In diesen Fällen wird das Zylindergefäß nur in bestimmten Intervallen neu gefüllt. Die Zeitabstände müssen so bemessen sein, daß eine Aufwärmung des Wassers im Gerät 1-2 °C nicht übersteigt. In der eigenen Versuchsanordnung wurden diese Bedingungen durch Zufuhr von jeweils 2 l Testwasser im 8-Minutentakt erfüllt (Abb. 2).

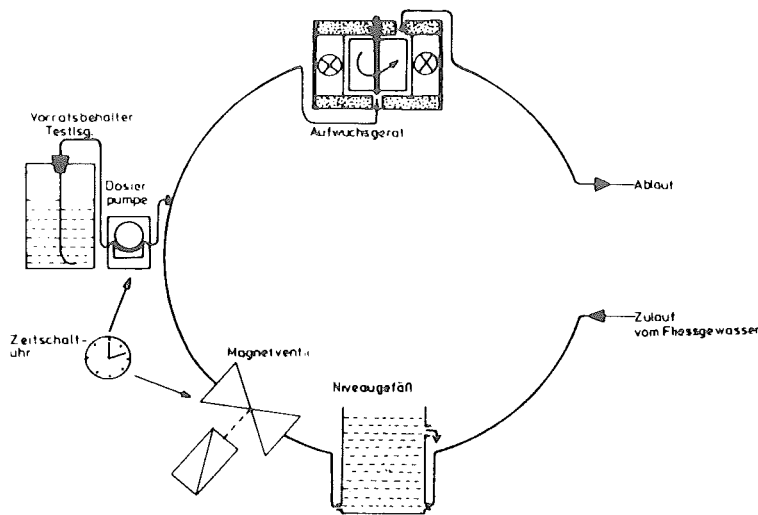


Abb. 2 Dosierzyklus für die Dosierung von Schadstoffen und Rhein- bzw. Buschbachwasser in die Testgeräte.

Die standardisierenden Rahmenbedingungen wie Dauerlicht = 1000 lux, Lichtfarbe: Universal Weiß, Wasserbewegung = 65 cm/s, Expositionsdauer = 3-4 Wochen (im Winter etwas länger) wurden experimentell in Vorversuchen als optimal ermittelt.

2.2 Auswerteparameter

Wichtig für die Auswahl der Parameter war die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit, mit der eine Noxe angezeigt werden kann.

Mikroskopische Analyse: Direktbeobachtung des Aufwuchsrasens auf abgetrennten Folienstücken nach gleichmäßig verteiltem Raster, Bewuchsbildanalyse möglichst bis auf unterste taxonomische Einheiten, Abschätzung der Abundanzen nach einer 7-stufigen Skala.

(Hustedt-Skala: 1 = sehr selten, 2 = selten 3 = zerstreut, 4 = ziemlich häufig, 5 = häufig, 6 = sehr häufig, 7 = massenhaft).

Biomasseparameter

Zur Vermeidung einer subjektiven Flächenauswahl ist es für die Bestimmung der nachfolgenden Parameter erforderlich, den Bewuchs mehrerer statistisch verteilter Kleinareale zu einer Gesamtprobe zu vereinigen.

- 1) Trockengewicht und aschefreies Trockengewicht: Bei 105 °C und 550 °C (im Muffelofen).
- 2) Chlorophyllgehalt: Bestimmung von Chlorophyll nach NUSCH & PALME (1975), Extraktion mit heißem Äthanol im Ultraschallbad.
- 3) Proteingehalt: Microbiuretmethode nach ITZHAKI und GILL (1964),

Bioaktivitätsparameter

- 1) Sauerstoffproduktionspotential im Labor (SPL): Hell-Dunkelflaschen-Exposition von Folienabschnitten in Standortwasser (nach Beendigung der Testläufe) im Lichtthermostaten (18 h) unter kontinuierlicher Rotation (vergl. VOLLENWEIDER 1969).

- 2) ATP-Bestimmung mit Luminometer 1250 von LKB-Wallac unter Verwendung von Boehringer ATP-Biolumineszenz CLS nach der Vorschrift von Boehringer (Standard-Addition). Zur Stabilisierung des mit heißem Tris extrahierten ATP während des Meßvorganges Addition von nucleotidfreisetzendem Reagenz (NRB, Abimed) zur Probe.
- 3) Dehydrogenasenaktivität als Maß des oxidativen Stoffwechsels nach DEV. Die sonst für Abwässer oder Schlamm zur Bestimmung von toxischen Effekten verwendete Methode (vergl. ZIMMERMANN, 1975) zeigt auch bei der Anwendung auf Periphyton eine sehr hohe Empfindlichkeit. Inkubationszeit für die ausgestanzten Folienplättchen: 4 Stunden. Die Eigenfärbung der Probe durch Chlorophyll wird durch Messung der Extinktion bei 2 verschiedenen Wellenlängen (440 nm und 481 nm) und Einsetzen in die Gleichung:

$$\text{Extinktion Formazan} = \frac{\text{Ext. 481 nm} - (k \cdot \text{Ext. 440 nm})}{i}$$

berücksichtigt, wobei k und i empirisch ermittelte Konstanten sind.

3. Testdurchführung

Um die Frage der Adaptation von Mikrophyten an Schadstoffe in vorbelasteten Gewässern bzw. die eventuell höhere Empfindlichkeit von Aufwuchs aus unbelasteter Umgebung zu klären, wurden Tests sowohl am Rhein bei Maxau wie an einem kleinen sauberen Bach bei Ettlingen/Baden durchgeführt.

3.1 Charakterisierung der Testgewässer

Laut Gewässergütekarte 1981 für Baden-Württemberg ist der Oberrhein bei Maxau als kritisch mit organischen Stoffen belastetes Fließgewässer einzustufen. Seine Sauerstoffversorgung kann dagegen als gut bezeichnet werden. Hervorzuheben ist die ungewöhnlich hohe Belastung mit Chlorid (vergl. Tab. 1). Durch Flußbegradigung und Uferbefestigung ist die biologische Besiedlungsmöglichkeit stark eingeschränkt und die Strömungsgeschwindigkeit mit 1-2 m/s sehr hoch.

Der Buschbach ist ein unbelasteter Bach (Rhital) des Nordschwarzwaldrandes, der von der Quelle ausgehend einige 100 m durch ein Waldgebiet fließt und bis zu der Stelle unserer Wasserentnahme ca. 500 m durch Wiesen und Obstgärten verläuft.

Mittelwerte einiger wichtiger chemischer Kenndaten für die Testgewässer

	Rhein b. Maxau (1980)	Buschbach (1982)
pH	7,6 ± 0,2	7,8 ± 0,3
T °C	12,8	10,2
Leitf. /uS	629	157,2
Ges.Härte mval	3,2	1,6
HCO ₃ ⁻ mg/l	150	11
DOC mg/l	2,5	0,93
CSB (MnO ₄) mg/l	2,7	1,21
Ca ²⁺ mg/l	49,2	24,2
Mg ²⁺ mg/l	9,1	5,0
Na ⁺ mg/l	88,9	3,75
K ⁺ mg/l	5,6	1,3
Cl ⁻ mg/l	131	6,6
NO ₃ -N mg/l	1,79	2,5
NO ₂ -N mg/l	n.g.	0,04
NH ₄ ⁺ -N mg/l	0,19	< 0,1
O-PO ₄ -P mg/l	0,11	< 0,03
Ges.-P mg/l	0,19	0,14
Cr /mg/l	2,0	< 2,0
Zn /mg/l	33,7	< 30
Pb /ug/l	< 5,0	< 5
Hg /ug/l	0,1	< 0,05
Cd /ug/l	2,1	< 0,3

n.g. = nicht gemessen

Für sein Wasser ist eine niedrige Gesamthärte, eine geringe Alkalinität und Mineralienarmut kennzeichnend (vergl. Tabelle). Der Ammonium-Stickstoff liegt unterhalb der Nachweisgrenze, Nitrit, Phosphat und der organ. gebundene Kohlenstoff (DOC) zeigen äußerst niedrige Werte. Ebenfalls unter der Nachweisgrenze liegt der Schwermetallgehalt des Buschbach-Wassers.

3.2 Testläufe

Aus der vom Projektgeber vorgegebenen Liste wurden folgende Stoffe in das Testprogramm aufgenommen: Hg, PCP, Phenol, Dodecylsulfat, 2,4 D, Trichloräthylen, Anilin, Methanol.

Die Verteilungsinhomogenitäten auf den Substratfolien (trotz makrooptisch oft gleichgearteten Bewuchsbildern) erfordern zur Erzielung einer hinreichenden statistischen Sicherheit den Einsatz von jeweils 3 Parallelansätzen für die Kontrolle und die einzelnen Konzentrationsstufen.

Die bei den Testauswertungen anfallenden Primärdaten können im Einzelfall deutliche Korrelationen zu den Dosiermengen aufzeigen, wie

es in den Tests mit Phenol bei den Parametern Chlorophyll a, Dehydrogenasenaktivität und ATP (in der Abb. 3) der Fall ist.

Jedoch sind in einem so komplexen System, wie es die Biocoenose darstellt, derartige Abhängigkeiten und Reaktionen nur in relativ seltenen Fällen exakt reproduzierbar. Bei einer Vielzahl von Parallelansätzen wird eher eine breite Streuung der Einzelwerte die Regel sein. Dies führte in der Tat zunächst zu Problemen bei der Auswertung der Testläufe.

Aus der Überlegung heraus, daß zumindest einige der gemessenen Parameter von einander nicht ganz unabhängig sind, wurde jeder Parameter mit jedem anderen (von jeweils ein- und derselben Aufwuchsprobe) korreliert. Falls nämlich eine solche Korrelation vorhanden ist, und sei sie noch so gering, so kann man zufällige Streuungen

von Werten zumindest teilweise dadurch herausfiltern, daß man diese Parameter durch einander dividiert. Man erhält dadurch eine Art normierten Wert, der den Informationsgehalt beider Variablen zusammenfasst und so durch die Verminderung der Variabilität bei den Parallelen eine bessere Trennung zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen ermöglicht.

Testreihen mit Phenol

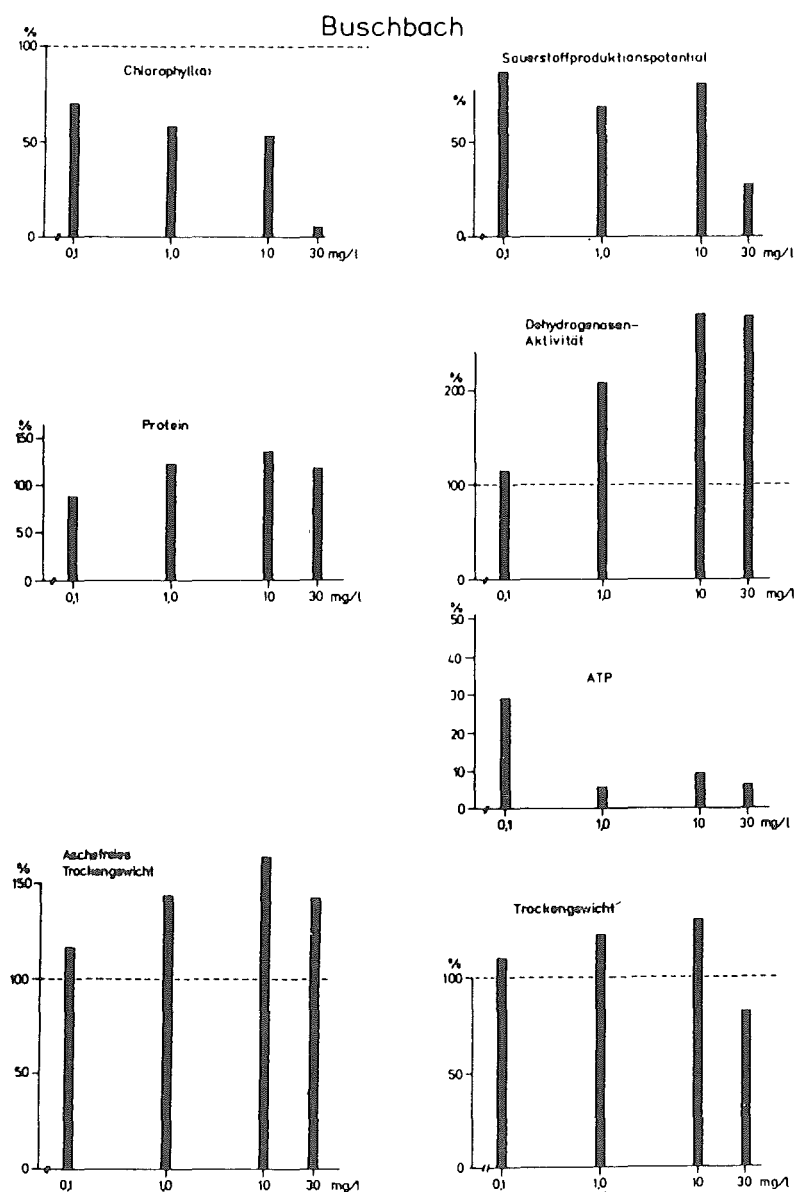


Abb. 3 Tests mit Phenol. Einzelne Parameter in Abhängigkeit von der Schadstoffkonzentration (Abstand logarithmisch) im Vergleich zu den Werten der Kontrollen (Kontrollen = 100 %).

Eine nachweisbare Abhängigkeit untereinander besteht zwischen Chlorophyll a und Sauerstoffproduktionspotential, zwischen Chlorophyll a und Protein und schließlich zwischen ATP-Gehalt und Dehydrogenasenaktivität. Es wurden deshalb folgende Quotienten gebildet:

$$\frac{\text{Chlorophyll a}}{\text{SPL}}, \quad \frac{\text{Chlorophyll a}}{\text{Protein}} \quad \text{und} \quad \frac{\text{ATP}}{\text{Dehydrogenasenaktivität}}$$

Diese Quotienten wiesen innerhalb der Parallelen eine deutlich geringere Streuung auf als die Einzelwerte.

In der weiteren Darstellung der Ergebnisse werden nur die auf diese Weise gewonnenen normierten Werte wiedergegeben und kommentiert.

Der Quotient Chlorophyll a/SPL kann als Maß für die Effektivität der Photosynthese angesehen werden. Veränderungen können durch Verringerung der Beschattung der Algen infolge verminderter Zelldichte oder durch Schädigung der Photosynthese in der Zelle selbst verursacht sein. Der Quotient $\frac{\text{Chlorophyll a}}{\text{Protein}}$ kann als Maßzahl für das Verhältnis von autotropher zu gesamter Biomasse verstanden werden. ATP und Dehydrogenasen stehen über die oxidative Phosphorylierung miteinander in Zusammenhang.

3.3 Ergebnisse mit Hg (Abb. 4)

Dosierung in Form von HgCl_2 . Die Testkonzentration von 100 $\mu\text{g/l}$ und 1000 $\mu\text{g/l}$ Hg sind in den Graphiken nicht mehr dargestellt, weil sich in diesen Fällen kein Bewuchs ansiedelte.

Beim Quotienten Chlorophyll/Protein ist beim Rhein eine leichte Verschiebung der Reaktionsschwelle zu höheren Konzentrationen erkennbar. Hingewiesen sei auf die starke Zunahme des ATP/Dehydrogenasen-Quotienten mit ansteigender Hg-Konzentration. Ein ähnlicher Verlauf ist nur noch beim PCP zu beobachten, während bei den übrigen Stoffen eine Abnahme zu erkennen ist.

Die Artenanalyse zeigt, daß die Grünalgen (vergl. Protoderma und Sphaerobotrys in Abb. 4) empfindlicher reagieren als die Diatomeen. Im Rhein tritt bei höheren Konzentrationen *Pseudanabaena galeata* auf, die offenbar gegen Quecksilber eine relativ hohe Toleranz hat.

3.4 Ergebnisse mit Phenol (Abb. 5)

Rhein und Buschbach zeigen im Vergleich kaum Unterschiede. Bei beiden Testorten verändert sich das Bewuchsbild mit zunehmender Konzentration drastisch durch massenhaftes Auftreten von Bakterienzooglooen

Testreihen mit Hg

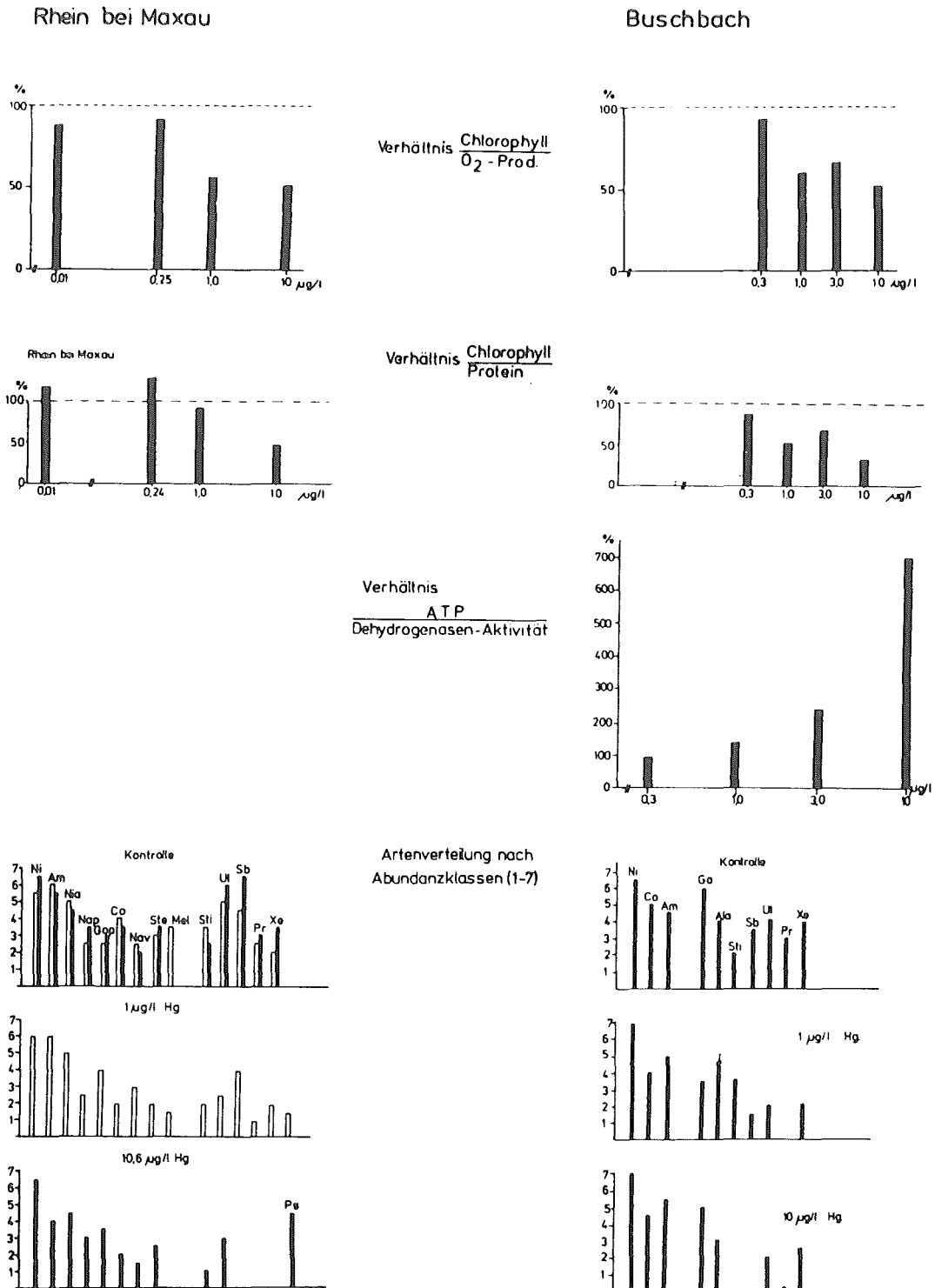


Abb. 4 Tests mit Hg, Vergleich der in Kap. 3.2 besprochenen Quotienten bei Rhein (linke Spalte) und Buschbach (rechte Spalte) mit den Kontrollen (=100 %). Abstand der Konzentrationen logarithmisch. Offene Balken im linken Abundanz-Diagramm: 1 µg/l Hg bzw. zugehörige Kontrolle, da 1 µg/l Hg und 10 µg/l Hg in verschiedenen Testläufen getestet wurden.

Ni = der ganze Formenkreis kleiner lanceolater Nitzschien, überwiegend *Ni. paleacea*, Am = *Achnanthes minutissima*, Nia = *Nitzschia acicularis*, Nap = *Navicula pelliculosa*, Co = *Cocconeis placentula*, Go = *Gomphenoma angustatum* var. *producta*, Nav = *Navicula avenacea*, Ste = *Stephanodiscus astraea*, Ala = *Achnanthes lanceolata*, Mel = *Melosira granulata*, Sti = *Stigeoclonium falklandicum*, Ul = *Ulvella frequens*, Sb = *Sphaerobotrys fluviatilis*, Pr = *Protoderma spec.*, Xe = *Xenococcus minimus*.

Testreihen mit Phenol

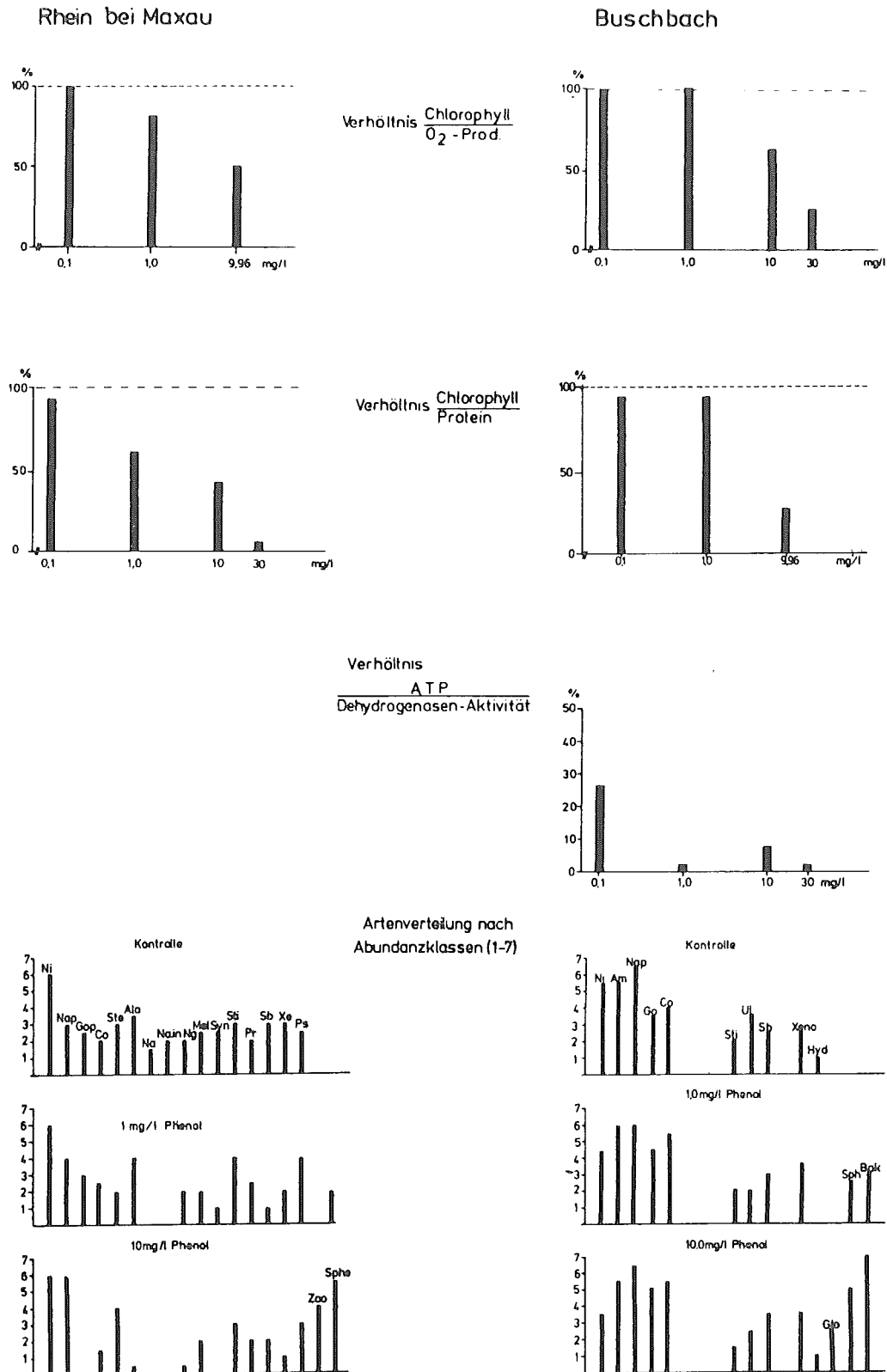
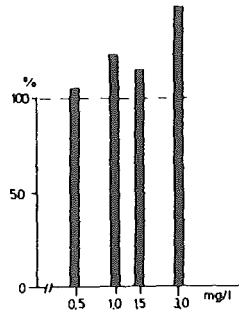


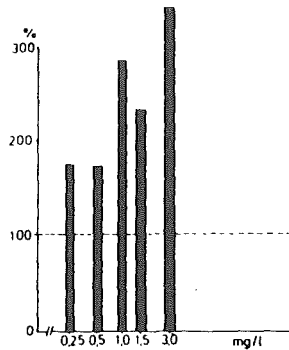
Abb. 5 Tests mit Phenol, Vergleich von Rhein (links) mit Buschbach (rechts), dargestellt sind die Quotienten der in Abb. 3 abgebildeten Parameter. Syn=*Synedra nana*, Hyd=*Hydrococcus cesatii*, Glo=*Gloxiidium rotatoria*, Sph=*Sphaerotilus natans*; Bak, Zoo= Bakterienzoogloea, Ps=*Pseudanabaena galeata* (andere Abkürzungen vergl. Abb. 4).

Testreihen mit PCP

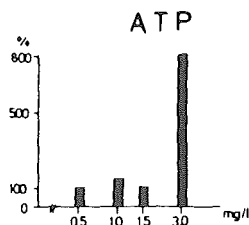
Rhein bei Maxau



Verhältnis Chlorophyll / O₂-Prod

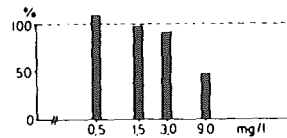
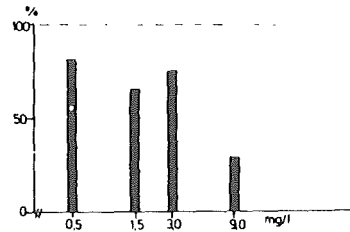


Verhältnis Chlorophyll / Protein

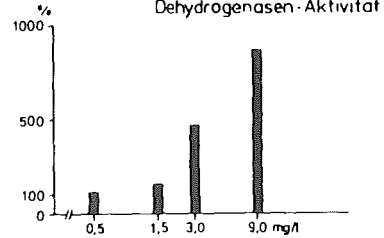


ATP

Buschbach



Verhältnis ATP / Dehydrogenasen-Aktivität



Artenverteilung nach Abundanzklassen (1-7)

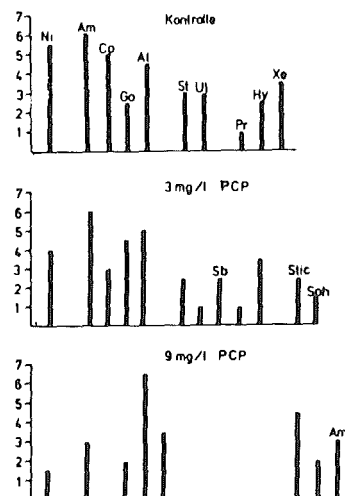
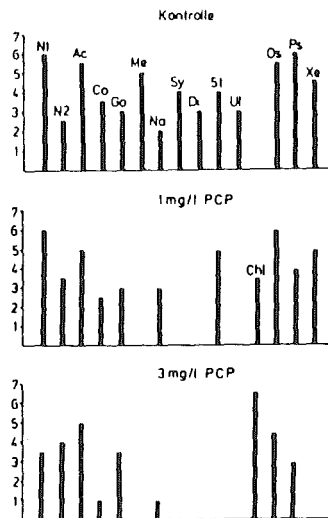


Abb. 6 Testreihen mit Pentachlorphenol, links Rhein b. Maxau, rechts Buschbach.

Ni, N₁=Formenkreis der kleinen lanceolaten Nitzschien, N₂=Nitzschia pelliculosa, Di=Diatoma vulgare, Os=Oscillatoria spec., Stic=Stichococcus bacillaris, Hy=Hydrurus foetidus, Chl=Chlorella spec. (andere Abkürzungen in Abb. 4).

und *Sphaerotilus natans*, bei den Rhein-Proben stärker als im Buschbach. Makroskopisch besitzt der Bewuchs eine schleimig-gallertige Konsistenz. Die empfindliche Reaktion des Quotienten ATP/Dehydrogenasenaktivität ist möglicherweise erklärbar durch den Rückgang der Photophosphorylierung infolge der Verminderung der autotrophen Bewuchsbildner.

3.5 Ergebnisse mit Pentachlorphenol (Abb. 6)

Eingesetzt wurde das Dinatriumsalz. Auffällig ist die Zunahme der Quotienten Chlorophyll/O₂-Produktion und Chlorophyll/Protein beim Rhein-Periphyton als Folge der zunehmenden Dominanz einer *Chlorella*-Art. Ausserdem sei auf die sehr starke Zunahme des ATP/Dehydrogenase-Quotienten beim Buschbach hingewiesen.

Testreihen mit Dodecylsulfat

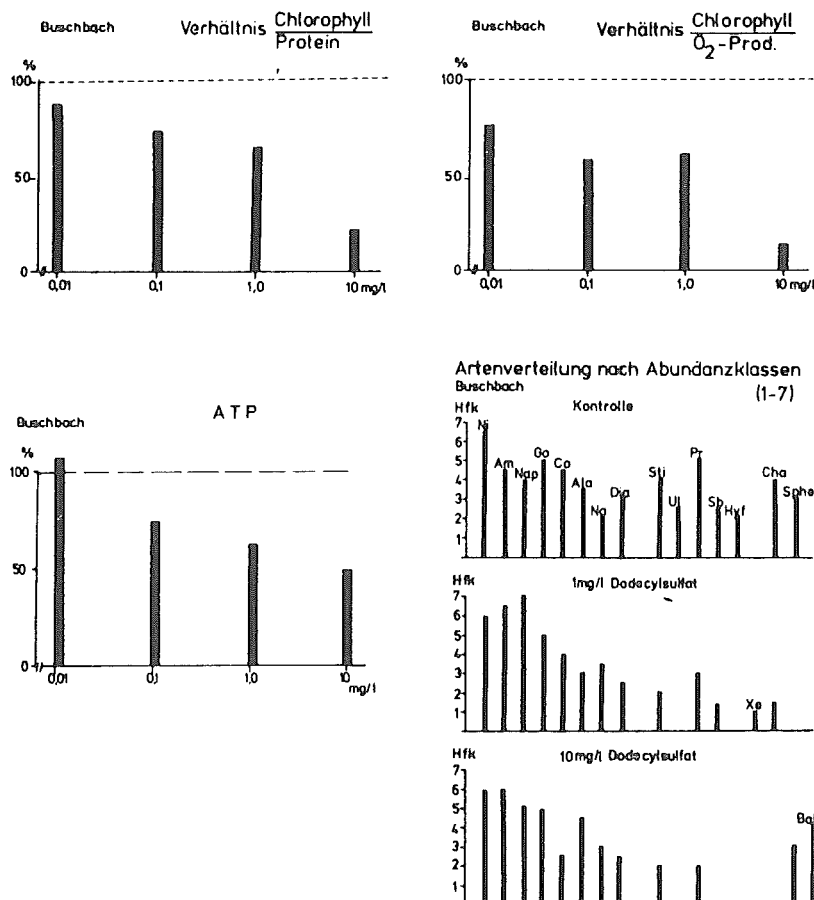


Abb. 7 Tests mit Dodecylsulfat. Die ATP-Werte sind ohne Quotientenbildung dargestellt, da wegen Geräteausfall keine Dehydrogenasenaktivitäten gemessen werden konnten. Na = *Navicula avenacea*, Hyf = *Hydrurus foetidus* (Sohlenstadien). Cha = *Chamaesiphon fuscus*, Bak = Bakterien.

3.6 Ergebnisse mit Dodecylsulfat (Abb. 7)

Dieser Vertreter der oberflächenaktiven Substanzen konnte wegen Ausfall des Rhein-Versuchsgeländes nur am Buschbach getestet werden. Die Dehydrogenasenaktivität war aus technischen Gründen nicht zu ermitteln. Die größten Veränderungen zeigen die Grünalgen. *Chamaesiphon fuscus* und *Hydrurus foetidus* verschwinden bei höheren Konzentrationen völlig.

3.7 Ergebnisse mit 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (Abb. 8)

Methanol wurde als Lösungsvermittler in Konzentrationen bis maximal 0,2 µg/l eingesetzt. In dieser Konzentration kann es als toxisch unwirksam für den Aufwuchs angesehen werden (vergl. Versuche mit Methanol). Nur der Quotient ATP/Dehydrogenasenaktivität zeigt eine starke Verminderung bei Konzentrationszunahme. Die Artenabundanz wird nicht wesentlich verändert, abgesehen von der Abnahme

einiger Diatomeenarten und dem Auftreten von *Spaerocillus natans* bei 100 µg/l 2,4 D (nicht mehr dargestellt).

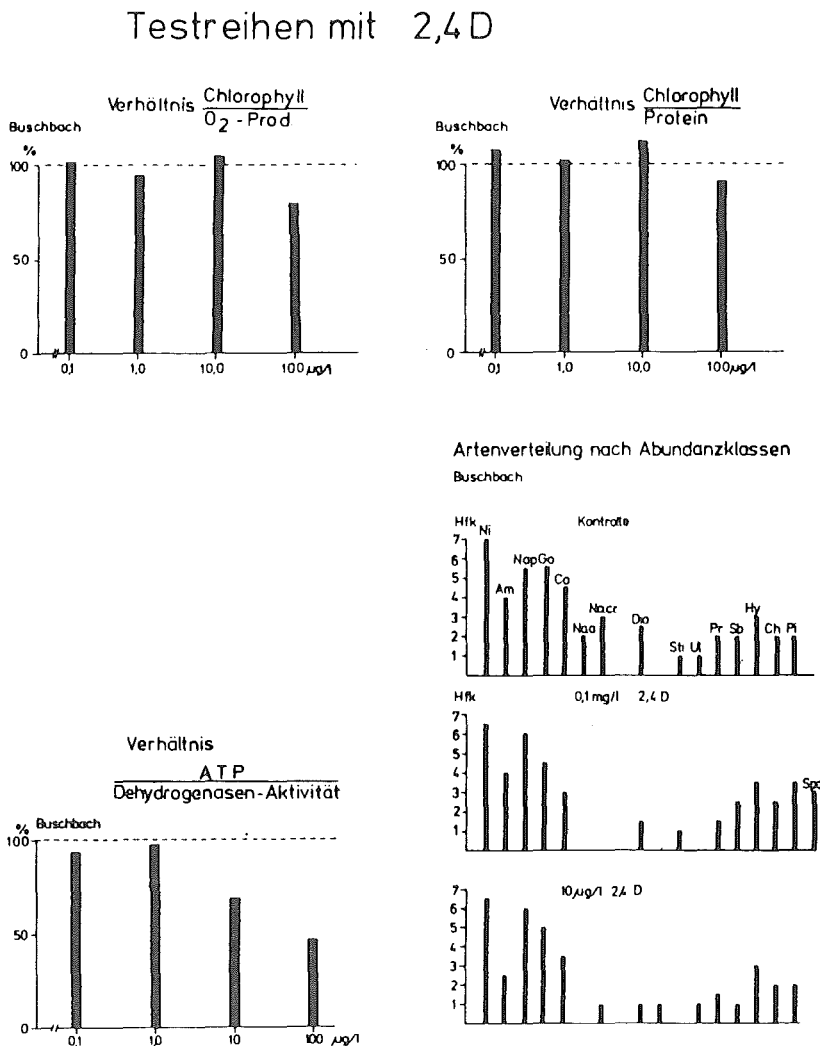


Abb. 8 Tests mit 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure.

Na.a.=Navicula avenacea, Na.cr=Navicula cryptocephala, Ch=Chamaesiphon fuscus, Hy=Hydrurus foetidus, Pi=Pilzhyphen, Spo=Sporotetras pyriformis (andere Abkürzungen vergl. Abb. 4).

3.8 Ergebnisse mit Methanol, Trichloräthylen und Anilin (Abb. 9)

Bereits bei den Orientierungstests zum Auffinden der Reaktionsschwellen zeigten sich Grenzen für den Einsatz bzw. die Bewertung dieser Stoffe. Bei Methanol war erst durch eine für Freilandgewässer unrealistisch hohe Konzentration von über 250 mg/l ein Effekt zu erzielen. Die Bewuchsänderung war derjenigen von Phenol vergleichbar. Trichloräthylen und Anilin waren in der Höhe der für die Stammlösungen benötigten Konzentrationen nicht mehr in Lösung zu bringen. Deshalb wurden die Tests mit diesen Substanzen nicht weitergeführt.

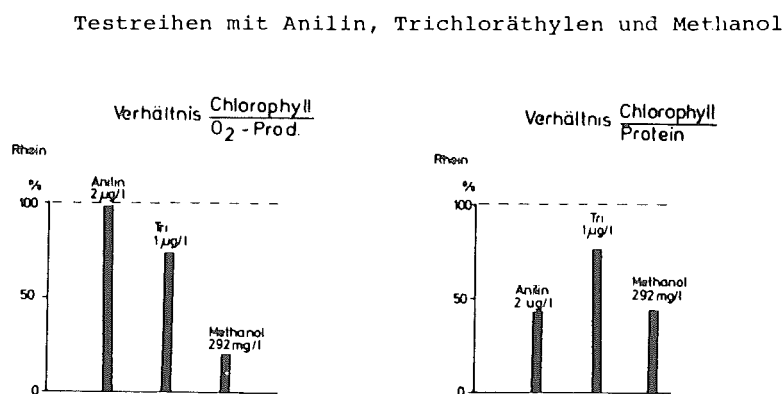


Abb. 9 Tests mit Anilin, Tri und Methanol. Nur Vorversuche (vergl. Text), deshalb nur einige wichtige Werte dargestellt.

4. Diskussion

Das Besondere des hier erprobten Testsystems ist zum einen die Möglichkeit, einen weitgehend naturnahen Mikrophytenaufwuchs unter kontrollierbaren, standardisierbaren Bedingungen zu erzeugen. Zum zweiten ermöglicht es Untersuchungen einzelner umweltschädlicher Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf eine gesamte Biozönose. Hierin liegt ein Vorteil gegenüber Freilanduntersuchungen, die immer starken Einflüssen von Außenfaktoren, in der Regel sogar schwankender Konzentration und Zusammensetzung, ausgesetzt sind.

Vergleichbare Ansätze sind aus der Literatur sehr wenig bekannt. Untersuchungen von SCHANZ & BETSCHART (1979) oder BRAUNE (1971) verwenden zwar Ökosysteme als Testobjekte, können aber nicht gezielt Einzelsubstanzen testen. Am besten läßt sich mit unserem Testsystem noch das System von GERHART, ANDERSON & RICHTER (1977) vergleichen (ähnliche Versuch-Anordnungen verwendeten EICHENBERGER, 1967 bzw. MÜLLER-HAECKEL, 1973), wo in Gerinnen unter kontrollierten Bedingun-

gen ein Bewuchs auf verschiedenen Substraten erzeugt wird. Dieses System ist jedoch aufwendiger als das hier beschriebene und wegen seiner Größe auch in höherem Maße ortsgebunden.

Von allen untersuchten Parametern stellten sich der ATP-Gehalt und die Dehydrogenasen-Aktivität als die für Gifteinwirkungen empfindlichsten Indikatoren dar. Diese Werte sind zwar mit relativ großer Streuung behaftet und außerdem ist ihre Ermittlung sehr zeitraubend. Trotzdem sollte auf diese Parameter, die neben der Bioaktivität der Algen die Aktivität der Bakterien u.a. Aufwuchskomponenten mit erfassen, nicht verzichtet werden. Die Umrechnungsfaktoren von ATP in Algen-Biomasse schwanken allerdings zwischen 265 (HOLM-HANSEN, 1973) und 400 (WEBER, 1973a).

Protein läßt sich mit relativ geringer Streubreite ermitteln und gibt die Biomasse des gesamten Bewuchses besser wieder als z.B. der Parameter "aschefreies Trockengewicht". Allerdings ist die Empfindlichkeit, was Veränderungen bei Einwirkungen von Noxen angeht, nicht sehr hoch einzustufen, es ergibt jedoch durch Verknüpfung mit dem Chlorophyllgehalt eine sinnvolle Aussage.

In der summarischen Bewertung der Einzelergebnisse haben sich bei fast allen Tests die Grünalgen empfindlicher gezeigt als die Diatomeen (Ausnahme Phenol, Abb. 5). Ferner sind die heterotrophen Bewuchsbildner (Pilze, Spaerotilus, Zoogloea) unempfindlicher als die Algen, d.h. sie treten meist erst bei kräftiger Abnahme der Algen auf.

Die aus Chlorophyll a, Protein, O_2 -Produktionspotential, ATP und Dehydrogenasenaktivität gebildeten Quotienten haben bei den Testläufen ihre Eignung zur Ermittlung von Veränderungen in der Struktur des Bewuchses gut unter Beweis gestellt. In den meisten Fällen nimmt ihr Wert mit zunehmender Giftmenge ab, bedingt durch den zunehmenden Anteil an heterotrophen Komponenten, wie es auch die Artenanalyse des Bewuchses bestätigt. Eine Ausnahme bilden die Versuche mit PCP am Rhein (wegen Chlorella-Massenentwicklung). Beim Quotienten
$$\frac{\text{ATP}}{\text{Dehydrogenasenaktivität}}$$
 ist im Gegensatz zu den anderen Giften eine Zunahme sowohl bei $HgCl_2$ wie bei PCP festzustellen.

Die aus unseren Versuchen resultierenden Empfindlichkeiten der Aufwuchs-Biozönose gegenüber Schadstoffen steht in Übereinstimmung mit den in der Literatur aufzufindenden Angaben von Algentoxizitätstests,

zum Teil scheint die Biozönose sogar etwas empfindlicher zu sein als einzelne Algenarten.

BRINGMANN und KÜHN (1976) geben für *Microcystis aeruginosa* als toxische Grenzkonzentrationen folgende Werte an:

5 $\mu\text{g/l}$ Hg, 4,6 mg/l Phenol, 63 mg/l Tri, 530 mg/l Methanol, 0,16 mg/l Anilin.

Bei Hg und Phenol sind erste Effekte in unseren Testansätzen mit geringfügig niedrigeren Konzentrationen (1 $\mu\text{g/l}$ bzw. 1 mg/l) zu erkennen. TAYLOR (1977) gibt Empfindlichkeiten von Algen gegenüber Hg herunter bis zu Konzentrationen von 0,1 bis 1 $\mu\text{g/l}$ an. Bei Methanol wird mit der Hälfte der o.g. Konzentration schon ein bedeutender Effekt erzielt. Eine wesentlich höhere Empfindlichkeit des biozönotischen Tests tritt bei Tri und Anilin hervor. Schon 1 $\mu\text{g/l}$ bzw. 2 $\mu\text{g/l}$ zeigten nachweisbare Effekte. Lineare Alkylsulfonate sollen lt. EG-Liste bei einer Konzentration von 5,6 mg/l das Wachstum von *Nitzschia linearis* und bei 3,8 mg/l das von *Chlorella pyrenoidosa* um 50 % hemmen. In unserem Test zeigten sich nachweisbare Veränderungen bereits ab 0,1 mg/l Dodecylsulfat. Für 2,4 D wird in den US Interim Drinking Water Standards (1958) 0,1 mg/l als Höchstwert für Trinkwasser angegeben. Die Fischtoxizität nach ALTHAUS und JUNG (1973) liegt beträchtlich höher (75 mg/l).

Diese Vergleiche zeigen, daß die hier erprobten Testmethode von ihrer Empfindlichkeit her die Voraussetzungen für die Untersuchung von Auswirkungen bestimmter Schadstoffe auf die Aufwuchsbiozönose gut erfüllt. Legt man bei den getesteten Substanzen als Bewertungsmaßstab für ihre toxische Wirkung diejenigen Konzentrationen zugrunde, bei denen in den zugehörigen Testläufen erste Anzeichen eines Effekts zu erkennen waren, so läßt sich folgende Reihe aufstellen, gegenüber der die Biocoenosen mit abnehmender Empfindlichkeit reagieren: Hg - Tri - Anilin - PCP - Phenol - Dodecylsulfat - 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure - Methanol.

Ein Vergleich zwischen den Testergebnissen von Rhein und Buschbach zeigt nicht den erwarteten Unterschied (Ausnahme PCP). Dies ist ein überraschendes Ergebniss, das nicht erwartet worden war. Es ergibt einen weiteren Hinweis auf die breite Einsetzbarkeit des untersuchten Testsystems.

Zieht man ferner seine leichte Handhabbarkeit und die Möglichkeit seiner Ausrichtung auf weitere Auswerteparameter wie z.B. Bioakkumulation, Nuklidanreicherung in Betracht, so erscheint der Aufwuchssammler außerdem als eine vielseitig verwendbare Einrichtung für die laufende Gewässerzustandsüberwachung.

Literatur

- BACKHAUS, D. (1967), Ökologische Untersuchungen an den Aufwuchsalgen der obersten Donau und ihrer Quellflüsse I. Voruntersuchungen. - Arch.Hydrobiol./Suppl. 30, (Donauforschung 2): 364-399.
- BRAUNE, W (1971), Zur Ermittlung der potentiellen Produktivität von Flußwasserproben im Algentest. - Int.Revue ges. Hydrobiol. 56,5: 795-810.
- BRINGMANN, G., KÜHN, R. (1976), Vergleichende Befunde der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Bakterien (*Pseudomonas putida*) und Blaualgen (*Microcystis aeruginosa*) - GWF-Wasser/Abwasser. Das Gas- und Wasserfach Jg. 117 (9): 410-413.
- DEUTSCHE EINHEITSVERFAHREN zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Fachgruppe Wasserchemie in der GDCh, Verlag Chemie, Weinheim (1960).
- DORTLAND, R.J. (1980), Toxicological evaluation of parathion and azinophosmethyl in freshwater model ecosystem. - Agric. Res. Rep. 898.
- EICHENBERGER, E. (1972), Ökologische Untersuchungen an Modell-Fließgewässer III. - Schweiz. Z. Hydrologie 34 (2): 173-189.
- GERHART, D.Z., ANDERSON, S.M. and RICHTER, J. (1977), Toxicity bioassays with periphyton communities: Design of experimental streams. - Water research, Vol. 11, 567-570.
- HOLM-HANSEN, O. (1973), Determination of total microbial biomass by measurement of adenosine triphosphate. p. 73-89 in Stevenson and R.R. Colwell (eds.): Estuarine and microbial ecology. Univ. So. Carolina.
- ITZHAKI, R.F. and GILL (1964), A micro-biuret method for estimating proteins. - Analyt.Biochem. 2: 401-410.
- MÜLLER-HAECKEL, A. (1973), Experimente zum Bewegungsverhalten einzelliger Grünalgen. - Hydrobiologia, Vol. 41: 221-235.
- NUSCH, E.A., PALME, G. (1975), Biologische Methoden für die Praxis der Gewässeruntersuchung. Bestimmung des Chlorophyll-a und Phaeopigmentgehaltes in Oberflächenwasser. - GWF-Wasser/Abwasser 116, H. 12: 562-565.
- SCHANZ, F., BETSCHART, B. (1979), The use of periphyton from lake Zürich to estimate the algal growth potential in river Limmat water. - Schweiz. Z. Hydrol. 41/1: 141-149.
- TAYLOR, D. (1977), A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. I. Mercury - Imperial Chemical Industries (ICI).
- THE US-INTERIM DRINKING WATER STANDARDS (1975), Federal register. BD. 40.
- VOLLENWEIDER, R.A. (1969), A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. - IBP Handbook No. 12. Blackwell scientific publications.
- WEBER (1973), Recent developments in the measurement of the response of plankton and periphyton to changes in their environment. in Glass, G. (ed.): Bioassay techniques an environmental chemistry - Ann Arbor Sc. Publ., pp. 119-138.
- ZIMMERMANN, A.P. (1975), Electron transport analysis as an indicator of biological oxidations in sediments. - Verh. Int. Verein. Limnol. 19: 1518-23.

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (O3 7293)

"Die Kombination eines unkomplizierten Chemikalientoxizitätstestes mit einem Multi-Spezies-Testsystem zur Erfassung synergistischer und sublethaler Effekte in aquatischen Ökosystemen"

von

Prof.Dr. A. Weber, Dr. Th. Christlieb u. Dr. U. Irmer

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg

Institutsleiter:

Prof. Dr. A. Weber

August 1984

1.2. EINLEITUNG

Algen stellen in vielen aquatischen Ökosystemen die wichtigsten Primärproduzenten dar, so daß Schädigungen dieser Organismusgruppe in Gewässern auch für die Konsumenten erhebliche Folgen haben können.

Angesichts der Tatsache, daß unsere Umwelt in immer noch steigendem Maße mit teilweise toxischen Chemikalien belastet wird, ist es deshalb ein wichtiges Vorsorgeprinzip, rechtzeitig auf Substanzen aufmerksam zu machen, die aquatische Primärproduzenten in ihrem Wachstum, ihrer Entwicklung usw. beeinträchtigen könnten.

Die meisten bisher entwickelten Testsysteme versuchen diesem Anspruch auf zwei verschiedene Weisen gerecht zu werden: entweder man untersucht einzelne Algenarten oder Mischungen einzelner Arten aus Reinkulturen (z.B. Bednarz, 1982; Maly et al., 1983), oder man versucht ein Ökosystem im Labormaßstab zu simulieren. Beide Verfahren haben Nachteile: Untersuchungen an einer Algenart können nur grobe Screening-Tests sein, die dennoch einen erheblichen Aufwand erfordern (logarithmisch wachsende Kulturen usw.). Simulierte Ökosysteme liefern aussagekräftigere Ergebnisse, deren Erstellung aber sehr langwierig ist und, wegen der eingeschränkten Raumverhältnisse, in ihrer Zusammensetzung dennoch mehr oder weniger zufällig bleiben.

Die von uns im folgenden dargestellten Systeme stellen unseres Erachtens demgegenüber Verbesserungen, sowohl in der Handhabbarkeit als auch in der Aussagefähigkeit, dar: Im Screening-Test (= Rot-Grün-Test) werden Ruhestadien (Akineten) einer Alge eingesetzt, so daß ständig physiologisch homogenes Material zur Verfügung steht. Das "Laborökosystem" ist wesentlich aussagefähiger als eine willkürliche Mischung einzelner Algenarten, denn es ist sowohl in seiner Sukzession als auch in seiner Zusammensetzung reproduzierbar stabil.

...

1.1. ZUSAMMENFASSUNG

In dem von uns bearbeiteten Forschungsprojekt haben wir die Wirkung einiger Schadstoffe auf zwei Algentestsysteme untersucht. Das erste System ist ein sehr einfach zu handhabendes, aber dennoch sehr empfindliches und breit anwendbares Screening-System, das darauf beruht, daß die Wiederergrünung rotgefärbter Dauerstadien von Chlorella zofingiensis (Grünalge) durch Messung der Chlorophyllsynthese verfolgt wird.

Das zweite System ist ein aus einem natürlichen Biotop gewonnenes Multi-Spezies-System, bestehend aus: Nitzschia palea, Chlorococcum sp., Monorophidium falcatus, Scenedesmus quadricauda, Scenedesmus obliquus (sowie einer Oscillatoria-Art, einer Amöbe und einem Zooflagellaten, die aber, ebenso wie die Bakterien, bei der Auswertung der Toxizitätstests unberücksichtigt blieben). Die Entwicklung der Algen erfolgt stets in einer charakteristischen Sukzession. Die Toxizität wird bei diesem System bestimmt als Reduktion des Wachstums der einzelnen Arten im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (mikroskopische Auswertung).

Folgende Ergebnisse scheinen uns besonders bemerkenswert:

- 1.) Das Rot-Grün-System zeigt ein breites Spektrum von Schadstoffen an und ist, trotz sehr einfacher Handhabung, nicht unempfindlicher als bisher übliche Algentests.
- 2.) Einige Schadstoffe, z.B. Pentachlorphenol, zeigen eine hohe Anfangstoxizität, die aber (innerhalb bestimmter Konzentrationsgrenzen) im Laufe des Versuches wieder aufgehoben werden kann.
- 3.) Eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Testmedium (durch NaCl) kann die toxische Wirkung eines Schadstoffes (z.B. von Paraquat) vollständig aufheben, oder sogar geringfügig verstärken.

...

- 4.) Das Multi-Spezies-System reagiert deutlich empfindlicher als das Rot-Grün-System, dabei ist besonders auffällig, daß einzelne Arten gegenüber unterschiedlichen Schadstoffen sehr unterschiedlich reagieren. Dies gilt sogar für die beiden nahe verwandten *Scenedesmus*-Arten.
- 5.) Das Multi-Spezies-System kann aus einer Mischung der Einzel-Arten nicht regeneriert werden.
- 6.) Ständige Belastungen des Systems mit Schadstoffkonzentrationen, die im Einzelversuch deutlich unterhalb der Nachweisgrenze liegen, können bei Dauerbelastung dennoch nachhaltige Störungen bewirken: Durch ein nur leicht reduziertes Wachstum werden einzelne Glieder aus dem System eliminiert. Wirkungen dieser Art können durch Mono-Algen-Systeme nicht erfaßt werden.

1.1. SUMMARY

In our research project we have examined the action of some toxicants on two different algal test systems.

The first system is very simple to handle but nevertheless a sensitive screening test with a wide range of applications. It is based on the regreening process of red coloured resting stages of Chlorella zofingiensis (green algae) and is evaluated by determining chlorophyll biosynthesis. (Weber, 1981).

The second systems, a multi-species-system, has been derived from a natural biotope sample. It consists of *Nitzschia palea*, Chlorococcum sp., Monoraphidium falcatus, Scenedesmus quadricauda, Scenedesmus obliquus. In addition an *Oscillatoria* species, an amoeba and a zooflagellate occur. These, as well as the bacteria, however are not taken into account in evaluating the test. The development of the different algae always follows a typical succession. Toxicity is

...

determined in this system as a reduction in growth of the different species as compared to the growth in an untreated control (microscopical determination of cell densities).

The following results seem to merit special attention:

- 1.) The "red-green-system" (regreening test) responds to a wide range of toxicants and is, in spite of its easy handling, no less sensitive than conventional algal toxicity tests.
- 2.) Some toxicants, such as pentachlorophenole show a high initial toxicity which (below certain threshold concentrations) can become canceled in the course of the experiment.
- 3.) An increase in ionic strength of the experimental medium (through addition of NaCl) can completely counter the toxic action of a pollutant (This is for example the case with paraquat). With other pollutants however the toxic action may be intensified.
- 4.) The sensitivity of the multi-species-system is distinctly greater than that of the red-green-system. It is conspicuous that different species of the system react differently upon addition of diverse pollutants. This even holds true for the closely related *Scenedemus* species.
- 5.) The multi-species-system can not be regenerated by simply mixing its algal components.
- 6.) Repeated exposure of the system to toxicant concentrations which in a single experiment show no significant toxic effect (no effect level), finally result in drastic disturbance: By slightly decreasing the growth of some members, these are eliminated from the system. This kind of effect can not be found out using only alga test systems.

...

2.1. Screening-Test - Rot-Grün-System

2.1.1. Kultivierung der Algen

Die Kultivierung von Chlorella zofingiensis (Stamm 211-14b, Algensammlung Göttingen) erfolgte in 300 ml Nährlösung fassenden Kulturröhren an einem Lichtthermostaten (Kniese, Marburg) bei 25°C, einem LD-Wechsel von 14:10 h (Beleuchtungsintensität 10 Klux) und unter Begasung mit Raumluft. Die Nitratkonzentration des auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellten Nährmediums (KESSLER und CZYGAN 1970) wurde um 90% reduziert. Nach 6- bis 8-wöchiger Kultivierung von Chlorella zofingiensis in diesem Nitrat-Mangelmedium sind die Chlorophylle der ursprünglich grünen Algen fast vollständig abgebaut; im gleichen Zeitraum werden Sekundärcarotinoide synthetisiert und innerhalb von Fetttropfen im Zytoplasma der sich allmählich rotfärbenden Algenzellen abgelagert (vgl. CZYGAN 1982). Die für die Untersuchungen verwendeten Algen (Akineten von Chlorella zofingiensis) hatten einen maximalen Chlorophyll-a-Gehalt von 0,8 mg pro 1 g Trockenmasse. Das Algenmaterial blieb mindestens 6 Monate lang physiologisch stabil, d.h. die Wiederergrünung der Algen bei Überführen in ein nitrathaltiges Medium war innerhalb dieses Zeitraumes voll reproduzierbar, wenn die roten Akineten unbelüftet bei 8°C gehalten wurden.

2.1.2. Durchführung der Toxizitätsuntersuchungen

Die Wiederergrünung der roten Akineten von Chlorella zofingiensis erfolgte in einem ionenreduzierten Medium mit einer Gesamtmolarität von 11 mM bei pH 6,5. Das Nährmedium hatte die folgende Zusammensetzung (mg/l):

KNO_3 : 303.33, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$: 24.65, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$: 5.37,
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$: 84.04, $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$: 2.42, H_3BO_3 : 0.180,
 $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$: 0.180, ZnCl_2 : 0.042, $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$: 0.010,
 $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$: 0.016, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$: 0.007, PIPES
(1,4-Piperazindiäthansulfonsäure): 302,36.

Die über Zentrifugation von der Mangelnährlösung getrennten und anschließend 2x mit dem nitrathaltigen Testmedium gewaschenen Algen wurden 2 bis 7 Tage lang bei 25°C und 3 Klux (Dauerlicht) in gasdicht verschlossenen 1 l oder 0,3 l Erlenmeyergefäßen mit 0,6 bzw. 0,1 l Testmedium kultiviert. Vorversuche zeigten, daß die Gasdichtigkeit der Kulturgefäße keinen Einfluß auf die Untersuchungsergebnisse hat. Eine Sedimentation der Algen wurde durch ständiges Schütteln der Kulturgefäße verhindert.

Um zu prüfen, ob bei den gewählten Testbedingungen die Wiederergrünung von der eingesetzten Zelldichte abhängt, wurde die Chlorophyllbiosynthese bei Einsatz unterschiedlicher Biomassen

bestimmt. Die Untersuchungen ergaben einen linearen Anstieg der Chlorophyll-a-Gehalte der Algen bei Einsatz von 10 bis 50 mg Trockenmasse/l. Die Phytotoxizität von Paraquat fiel bei diesen Zelldichten gleichermaßen stark aus. Erst bei Zugabe von mehr als 100 mg Algen (Trockengewicht) wurde die herbizide Wirkung dieser Substanz mit steigender Biomasse zunehmend verringert. Die Abnahme der Phytotoxizität korrespondierte dabei mit einer mangelnden Wiederergrünung der Algen in diesem hohen Biomassebereich, so daß die Ursache des beobachteten Phänomens wohl an der zunehmenden Selbstbeschattung der Algen bei Erhöhung der Zelldichte gelegen haben dürfte. Diese Untersuchungen zeigen, daß bei den vorgegebenen Testbedingungen ein Inokulum von 50 mg Trockenmasse/l nicht überschritten werden sollte. In allen nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde deshalb stets eine Zelldichte von 25 mg Trockenmasse pro Liter Testmedium eingesetzt.

Als Referenzchemikalien¹⁾ wurden Paraquat, (als Methylsulfat und Chlorid), Benzol, Phenol, 2- und 4-Nitrophenol, Pentachlorphenol (PCP), Anilin, 4-Chloranilin, Atrazin, Harnstoff, Methanol, Trichlorethylen, 1,2,4-Trichlorbenzol und 2,4-D in Form von wässrigen Stammlösungen eingesetzt. Die Phytotoxizität der Chemikalien wurde als Unterdrückung der Wiederergrünung gemessen. Die ermittelte Hemmung wird im folgenden als "% der Kontrolle" angegeben.

2.1.3. Toxizitätsmessung

Die quantitative Erfassung des Chlorophyll-a-Gehaltes der Algen kann grundsätzlich sowohl über photometrische in-vivo-Messungen (Extinktion bei 678 nm abzüglich Extinktion bei 750 nm) als auch über kaum aufwendigere in-vitro-Messungen erfolgen. Die in vitro Chlorophyllbestimmung erfolgte nach der von IWAMURA et al. (1970) entwickelten Methode über Extraktion der Pigmente mit heißem Methanol. Mit beiden Meßverfahren wurde ein linearer Anstieg der Extinktionswerte bzw. der absoluten Chlorophyllgehalte der Algen registriert, wobei jedoch der Anstieg der Geraden bei in-vivo-Messungen wesentlich geringer war als bei in-vitro-Messungen. Ursache hierfür dürfte ein durch Lichtstreuung an den Algen hervorgerufener Lichtverlust sein, der sich in der Messung niedrigerer Extinktionswerte niederschlägt. Weil bei in-vitro-Messungen eine höhere Meßgenauigkeit (Nachweisgrenze) erzielt werden kann und weil absolute Mengenangaben des gemessenen Chlorophyll a möglich sind, wurde diese Methode für die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen angewandt.

1) Die Referenzchemikalien wurden von der Firma Riedel De Haen bezogen. Paraquat wurde den Kulturen entweder als Chlorid (im folgenden Paraquat-cl) oder als Methylsulfat (im folgenden Paraquat-ms) zugegeben.

3.1. Screening-Test

Die Ergebnisse der im folgenden besprochenen Experimente wurden in der Regel für jeden Versuch aus drei voneinander unabhängigen Testreihen gemittelt.

3.1.1. Der Prozeß der Wiederergrünung

Abb. 1 zeigt die Wiederergrünung roter Akineten von Chlorella zofingiensis, sowie die Biomasse- und Zellzahlentwicklung über einen Versuchszeitraum von 7 Tagen in 1 l Kulturgefäßen. Während Biomasse und Zellzahl vom 2. zum 4. Tag nach Versuchsbeginn nur unwesentlich anstiegen, konnte eine äußerst starke Zunahme des Chlorophyllgehaltes beobachtet werden: Das Verhältnis Trockengewicht/Chlorophyll a sank rapide von ursprünglich 9464 über 175 nach 2 Tagen, auf 54 nach 3 Tagen ab und betrug schließlich nach 7-tägiger Kultivierungsdauer nur noch 39, was in etwa den in logarithmisch wachsenden (grünen) Algen bestimmten Werten entspricht.

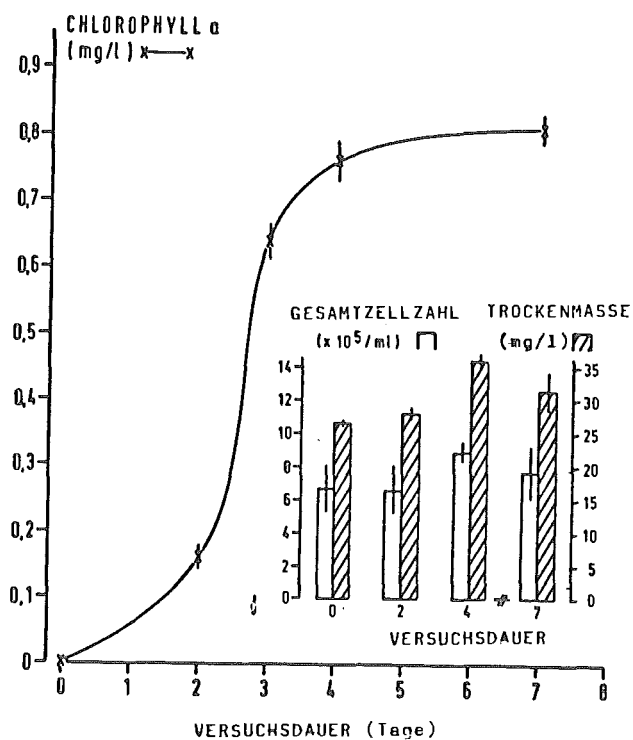


Abb. 1: Kinetik der Wiederergrünung und des Wachstums roter Chlorella zofingiensis in 1 l Erlenmeyergefäßen mit 0,6 l Testmedium.

Die Wiederergrünung erfolgte in den 300 ml Gefäßen aufgrund des höheren Lichtgenusses pro Einzelzelle wesentlich schneller als in den 1 l Kulturgefäßen: nach 2-tägiger Versuchsdauer lag der Chlorophyll a Gehalt hier bei durchschnittlich 0.436 mg/l.

3.1.2. Einfluß der Referenzchemikalien auf den Prozeß der Wiederergrünung

Die Wirkungen von Paraquat, PCP, 2-Nitrophenol, 4-Nitrophenol und 4-Chloranilin auf die Wiederergrünung roter Algen erwiesen sich sowohl im Hinblick auf die Sensibilität des Testsystems als auch in Bezug auf den gemessenen Toxizitätsverlauf als äußerst unterschiedlich:

- Paraquat-ms wirkte im Vergleich zu allen anderen getesteten Chemikalien am stärksten toxisch. Bereits nach 2 Tagen war bei Außenkonzentrationen von 0.10 und 0.25 μM eine bedeutende Hemmung der Wiederergrünung von 30 bzw. 75% zu verzeichnen. Während bei der niedrigeren Paraquatkonzentration im folgenden eine weitere signifikante Toxizitätszunahme nicht beobachtet wurde, stieg die Hemmung bei 0.25 μM bis zum 7. Tag nach Versuchsbeginn auf insgesamt 91% an. Paraquat-cl wirkte dagegen weniger stark giftig: nach Zugabe von 0.25 μM dieser Verbindung wurde gegen Versuchsende (7. Kultivierungstag) eine Hemmung der Wiederergrünung von durchschnittlich 66% festgestellt.
- Im Gegensatz zu Paraquat war die Kurzzeitwirkung von PCP bei Außenkonzentrationen von 0.10 und 0.25 μM wesentlich stärker als die Langzeitwirkung (vgl. Abb. 2): die jeweils stärkste Hemmung der Wiederergrünung ergab sich bei 0.10 μM PCP im Medium bereits nach einer Versuchsdauer von 24 h (31%-ige Hemmung) und bei 0.25 μM nach 48 h (57%-ige Hemmung). Anschließend "erholten" sich die Algen gleichermaßen gut: nach 4-tägiger Kultivierung mit PCP bestand in beiden Testreihen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich in abgeschwächter Form auch nach Zugabe von 0.5 μM

PCP. Erst bei einer Außenkonzentration von $1.0 \mu\text{M}$ war eine Regenerierung nicht mehr feststellbar (vgl. Abb. 2).

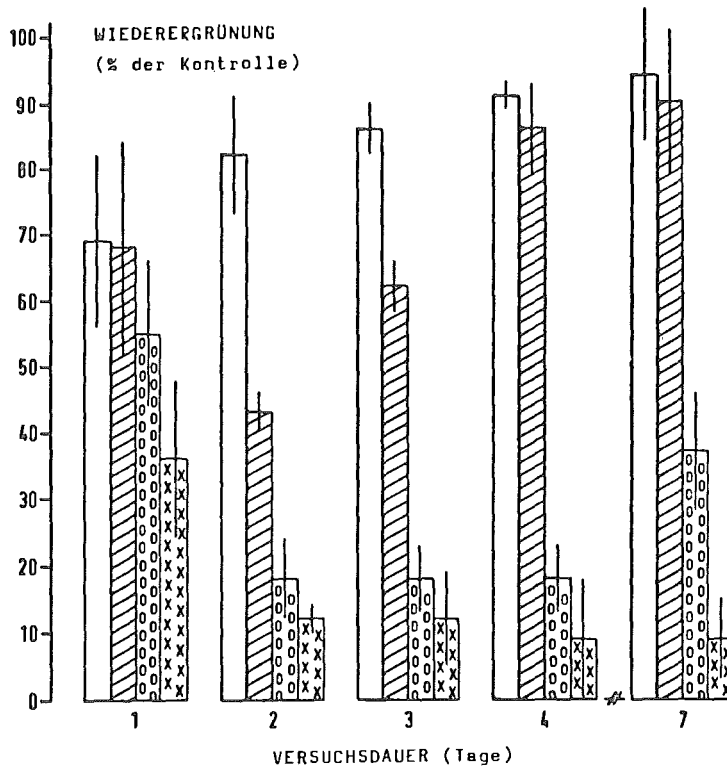


Abb. 2: Wirkung von PCP auf die Wiederergrünung roter *Chlorella zofingiensis*. Expositionsdauer 7 Tage. Es bedeuten:

- 0,10 μM PCP im Medium
- ▨ 0,25 μM PCP im Medium
- ▩ 0,50 μM PCP im Medium
- 1,00 μM PCP im Medium

- Die Nitrophenole wirkten auf die Wiederergrünung der roten Algen in wesentlich geringerem Maße toxisch. Zugaben von jeweils $100 \mu\text{M}$ 2- und 4-Nitrophenol ergaben nach 2-tägiger Versuchsdauer eine Hemmung von 83% bzw. 61%, die bis zum 4. Tag nach Versuchsbeginn annähernd konstant blieb, im folgenden Zeitraum dann aber, ähnlich wie bei PCP, wieder sehr stark abnahm. Gegen Versuchsende (7. Kulturtage) lagen die Chlorophyllgehalte der mit den entsprechenden Nitrophenolen behandelten Algen nur noch um 34% bzw. 38% unter den Kontrollwerten.

- 4-Chloranilin erwies sich im Vergleich zu allen anderen getesteten Chemikalien als am geringsten toxisch. Selbst 100 μM dieser Substanz bewirkten nach 7-tägiger Versuchsdauer lediglich eine Hemmung von durchschnittlich 24%. Eine zwischenzeitliche stärkere Phytotoxizität - wie bei PCP und den Nitrophenolen - war nicht zu beobachten.

Tab. 1: Wirkung verschiedener Umweltchemikalien auf die Wiederergrünung roter Chlorella zofingiensis. Expositionsdauer 48 h.

WIRKSTOFF	ED ₀	Schwellenwert	ED ₅₀	ED _{>80}
Paraquat-ms	0,05 μM	0,10 μM	0,15 μM	0,50 μM
Pentachlorphenol	0,01 μM	0,05 μM	0,16 μM	0,25 μM
Paraquat-cl	0,10 μM	0,25 μM	0,28 μM	1,00 μM
Atreazin	0,25 μM	0,50 μM	1,33 μM	nb
2-Nitrophenol	0,005 mM	0,010 mM	0,049 mM	0,100 mM
4-Nitrophenol	0,005 mM	0,010 mM	0,075 mM	0,250 mM
4-Chloranilin	0,050 mM	0,100 mM	0,717 mM	2,5 mM
Phenol	0,001 M	0,0025 M	0,0057 M	0,025 M
Benzol	0,001 M	0,0025 M	0,0067 M	nb
Anilin	0,001 M	0,0025 M	0,0075 M	0,025 M
Harnstoff	0,025 M	0,050 M	0,134 M	0,500 M
Methanol	0,025 M	0,100 M	0,222 M	0,500 M

3.1.3. Phytotoxizität der Referenzchemikalien im Kurzzeittest

Tab. 1 zeigt den Einfluß der Referenzchemikalien auf die Wiederergrünung der roten Algen nach einer konstanten Versuchsdauer von 48 h. Die Ergebnisse sind geordnet nach dem Grad der festgestellten Toxizität und in 4 Kategorien unterteilt:

- "ED₀" (höchste Konzentration, bei der keine signifikante Hemmung festgestellt wurde),
- "Schwellenwert" (niedrigste Konzentration, bei der eine signifikante Hemmung auftrat),
- "ED₅₀" (über Regressionsgeraden errechnete Konzentration, bei der eine 50%-ige Hemmung der Wiederergrünung vorlag) und
- "ED_{>80}" (niedrigste Konzentration, bei der eine Hemmung von über 80% festgestellt wurde).

Hiernach ergibt sich folgendes Bild:

- hoch-toxische Chemikalien ($ED_{50} < 10 \mu M$)
Paraquat-ms > PCP > Paraquat-cl >> Atrazin
- deutlich-toxische Chemikalien ($10 \mu M < ED_{50} < 1 mM$)
2-Nitrophenol > 4-Nitrophenol >> 4-Chloranilin
- schwach-toxische Chemikalien ($1 mM < ED_{50} < 1 M$)
Phenol > Benzol > Anilin >> Harnstoff > Methanol

Der auf das Streckungswachstum von höheren Pflanzen wirkende Wuchsstoff 2,4-D zeigte bis zur Löslichkeitsgrenze (höchste eingesetzte Konzentration 1 mM) keinen signifikanten Einfluß auf die Wiederergrünung der roten Akineten. Dieses Ergebnis erscheint nicht verwunderlich, da es sich bei dem beschriebenen Rot-Grün-System im Gegensatz zum Multi-Spezies-System um einen weitgehend wachstumsunabhängigen Toxizitätstest handelt, der vorwiegend durch katabolische und metabolische Stoffwechselvorgänge geprägt ist. Der Einsatz der Referenzchemikalien Trichlorethylen und 1,2,4-Trichlorbenzol führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen: Über einen weiten Konzentrationsbereich traten erheblich Schwankungen in der Phytotoxizität dieser Substanzen auf. Die mit beiden Chemikalien gewonnenen Ergebnisse waren als einzige nicht reproduzierbar.

Eine weitere Besonderheit ergab sich in den Untersuchungen mit Atrazin: Während mit allen anderen toxisch wirkenden Chemikalien innerhalb eines engen Konzentrationsbereiches eine Zunahme der Hemmung von 0 bis nahezu 100% beobachtet werden konnte (Konzentrationsunterschiede um den Faktor 10 bis maximal 100), war dies mit Atrazin nicht der Fall. Bei externen Atrazinkonzentrationen von $2,5 \mu M$ ergab sich eine durchschnittliche Hemmung der Wiederergrünung von 64%. Eine Erhöhung der Außenkonzentration bis auf $100 \mu M$ führte dann jedoch zu keiner weiteren Steigerung der Phytotoxizität.

Da bei Einwirkung niedriger PCP-Konzentrationen eine Phytotoxizität lediglich kurzfristig feststellbar war (vgl. Abb.2),

wurde untersucht, ob die Wirksamkeit des Pestizids während der Algenkultivierung aufgrund photooxidativer Prozesse nachläßt. Versuchsansätzen mit externen PCP-Konzentrationen von 0,10 und 0,25 μM wurden die Algen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 24 h und 48 h nach der PCP-Kontamination) zugegeben und die Wiederergrünung nach einer konstanten Versuchsdauer von 48 h bestimmt. Es zeigte sich bei beiden getesteten PCP-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf keine Verminderung der Phytotoxizität. Da photooxidative Prozesse auscheiden und PCP zu den relativ persistenten Umweltchemikalien gehört, könnte die an Chlorella zofingiensis beobachtete Kurzzeitwirkung subletaler PCP-Konzentrationen darauf zurückzuführen sein, daß PCP die ATP-Synthese hemmt (vgl. MORELAND 1980). Ein hierdurch verursachter Energiemangel könnte die Membran- und Chlorophyllbiosynthese verlangsamt ablaufen lassen. Mit zunehmender Steigerung der Photosyntheseleistung wird dieser Effekt möglicherweise neutralisiert, so daß die durch PCP verursachte Hemmung der Wiederergrünung allmählich aufgehoben wird.

Um herauszufinden, welche Schadstoffkonzentration eine letale Schädigung der Algen bewirkt, wurden diese nach einer Expositionszeit von 48 h abzentrifugiert, 2x mit frischer Nährlösung gewaschen und 5 Tage lang unter identischen Bedingungen in einem unbelasteten Nährmedium weiterkultiviert. Ein Vergleich der nach 2- und 7-tägiger Kultivierungsdauer erhaltenen Chlorophylldaten zeigte, daß 1 μM Paraquat-ms/-cl bzw. 10 μM PCP nötig sind, um die Algen innerhalb der 48 h-Exposition quantitativ abzutöten. Rekultivierungsversuche mit Algen, die zuvor jeweils 100 μM 2- und 4-Nitrophenol bzw. 4-Chloranilin ausgesetzt waren, verliefen hingegen ebenso positiv wie diejenigen mit unbehandelten Algen.

Die Empfindlichkeit unseres Screening-Tests ist, verglichen mit anderen Methoden der Toxizitätsbestimmung, sehr gut. Ein Vergleich der Wirkung von Paraquat-ms auf die Wiederergrünung der roten Algen mit der auf die Netto-Photosynthese und die

Chlorophyll a Synthese der aus logarithmisch wachsenden Kulturen entnommenen grünen Algen ergab bei einer Versuchsdauer von 48 h, ED₅₀-Werte von 0,15 μ M (Wiederergrünung), 0,21 μ M (photosynthetische O₂-Produktion) und 0,41 μ M (Chlorophyllbiosynthese).

3.1.4. Zusammenwirken mehrerer Belastungsfaktoren

Für Toxizitätsuntersuchungen spielt die Salinität des Testmediums eine entscheidende Rolle. Die bisher dargestellten Untersuchungen wurden in einem ionenreduzierten Medium durchgeführt, dessen Salinität ungefähr dem Salzgehalt eutrophierter Fließgewässer, wie der Elbe entspricht (vgl. SCHULZ 1961). Es gibt aber heute Flüsse (etwa die Werra), deren Salzbelastung aufgrund anthropogener Einflüsse stellenweise fast an jene der Nordsee heranreicht (vgl. SCHERF 1981). Es erschien daher sinnvoll und notwendig, die Phytotoxizität einiger Referenzchemikalien bei Zugabe steigender Salzmengen (NaCl suprapur) zu bestimmen.

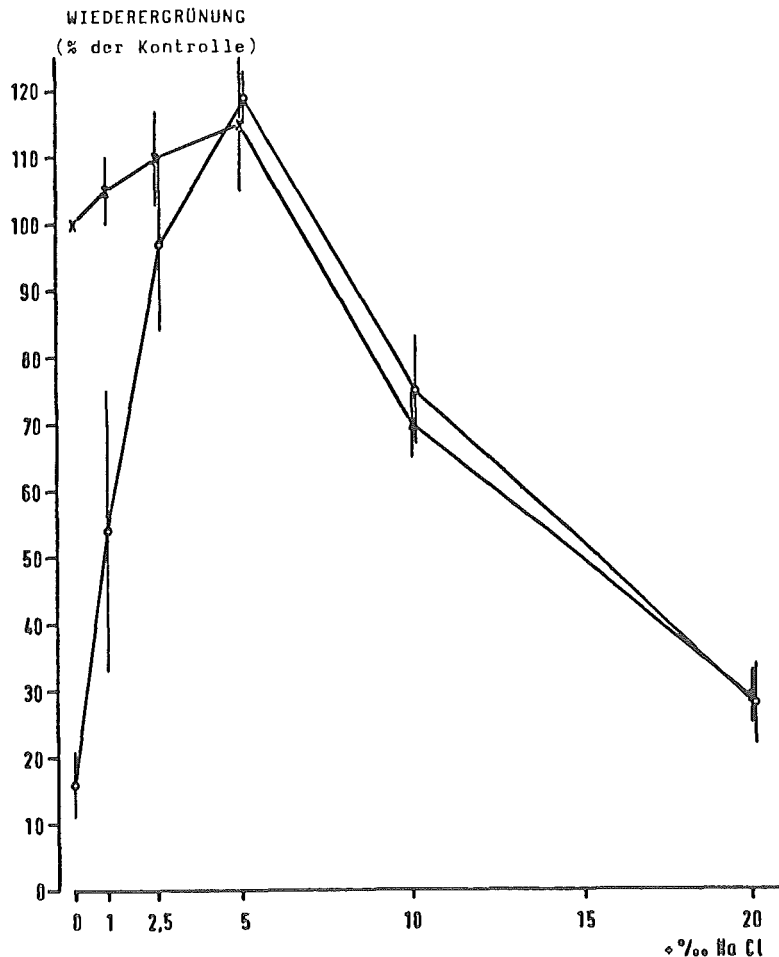


Abb. 31: Einfluß unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Testmedium auf die Wiederergrünung roter *Chlorella zofingiensis* (X) bei Zugabe von 0,32 μ M Paraquat-mg (o). Expositionsdauer 48 h.

Abb. 3 zeigt, daß ohne Schadstoffzugabe die Chlorophyllbiosynthese der ursprünglich roten Algen bis zu einer NaCl-Konzentration von 5% annähernd konstant blieb, bei höheren NaCl-Belastungen (10 und 20%) jedoch zunehmend reduziert wurde. Mit 0,32 µM Paraquat-ms im Nährmedium ergab sich ohne NaCl-Zugabe (Standardbedingungen) eine Hemmung der Wiederergrünung von durchschnittlich 84%, die jedoch bei Zugabe steigender NaCl-Mengen zunehmend abgebaut wurde: bereits ab 2,5% NaCl unterschieden sich die Chlorophyllgehalte der mit Paraquat behandelten Algen nicht mehr signifikant von den Kontrollen.

Tab. 2: Einfluß unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Testmedium auf die durch Paraquat-ms, PCP und 2-Nitrophenol verursachte Hemmung der Wiederergrünung roter *Chlorella zofingiensis*.
Expositionsdauer 48 h.

NaCl-KONZENTRATION	EXPERIMENT	WIEDERERGRÜNUNG IN % DER KONTROLLE					
		PARAQUAT-MS		PCP		2-NITROPHENOL	
		0.10 µM	0.50 µM	0.10 µM	0.50 µM	10.0 µM	50.0 µM
0 ‰	1	58	12	69	24	88	44
	2	53	10	68	22	82	37
	3	60	9	84	32	91	55
	M ± s	57 ± 4	10 ± 2	74 ± 9	26 ± 5	87 ± 5	45 ± 9
5 ‰	1	111	99	82	38	95	38
	2	94	88	75	27	80	28
	3	95	86	84	29	76	40
	M ± s	100 ± 10	91 ± 7	80 ± 5	31 ± 6	84 ± 10	35 ± 6
10 ‰	1	101	98	86	38	91	31
	2	101	101	83	34	81	29
	3	108	107	100	33	92	38
	M ± s	103 ± 4	102 ± 5	90 ± 9	35 ± 3	88 ± 6	33 ± 5

Die Phytotoxizität von Paraquat, PCP und 2-Nitrophenol erwies sich unter Standardbedingungen und bei NaCl-Zugaben von 5% (keine signifikante Beeinflussung der Wiederergrünung) bzw. 10% (deutliche Depression der Wiederergrünung von durchschnittlich 34%) als sehr unterschiedlich (vgl. Tab. 2). Während das Auftreten einer Paraquattoxizität selbst bei 0,5 µM Paraquat im Medium durch beide NaCl-Zugaben vollständig verhindert wurde, war dieser Effekt beim PCP nur sehr schwach ausgeprägt. Eine sogar gegensätzliche Tendenz ergab sich bei

Zugabe von 50 µM 2-Nitrophenol: Hier bewirkten steigende NaCl-Mengen eine leichte Zunahme der durch diesen Schadstoff hervorgerufenen Phytotoxizität. Im Hinblick auf die zu messende Hemmung der Wiederergrünung roter Chlorella zofingiensis erwies sich das zugegebene NaCl demnach als ausgesprochen starker Antagonist zum Paraquat, als schwacher Antagonist zum PCP und als schwacher Synergist zum 2-Nitrophenol (vgl. Tab. 2).

4. Das Multi-Species-System

4.1. Beschreibung des Systems

Das hier verwendete System wurde aus einer Rohprobe entwickelt (Freilandprobe) in der Weise, daß ein anorganisches Kulturmedium mit dieser Probe beimpft wurde. Die sich entwickelnden Organismen (Mischpopulation) wurden alle 7 Tage weitergeimpft, bis schließlich ein stabiles System, das hier beschriebene "Multi-Spezies-System" entstanden war. Es enthält: Die Kieselalge Nitzschia palea, die Grünalgen Chlorococcum sp., Monoraphidium falcatus, Scenedesmus quadricauda und Scenedesmus obliquus sowie die Blaualge Oscillatoria sp. Außerdem sind im System noch eine Amöbe, eine Mayorella-Spezies, die als Nahrungsquelle Nitzschia palea bevorzugt, und ein Zooflagellat enthalten, die regelmäßig zur Entwicklung kommen.

4.1.2. Kultivierung des Systems

Die Kultur des Multi-Spezies-Systems erfolgt in belüftbaren 1l Erlenmeyerkolben. Für die Kultivierung ist eine spezielle Nährlösung entwickelt worden, die sich wie folgt zusammensetzt:

KNO₃: 81 mg/l; NaCl: 47 mg/l; NaH₂PO₄ · H₂O:
47 mg/l; NaH₂PO₄ · 12 H₂O: 36 mg/l; CaCl₂ · 2 H₂O:
30 mg/l; ZnSO₄ · 7 H₂O: 0,2 mg/l; H₃BO₃: 0,5 mg/l;
MnCl₂ · 4 H₂O: 0,5 mg/l; FeSO₄ · 7 H₂O: 0,3 mg/l;
MgSO₄ · 7 H₂O: 10 mg/l; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 0,02 mg/l;
EDTA: 1 mg/l; Silizium als SiCl₄ (Titrisol): 5 mg/l.

Vor dem Sterilisieren der Nährlösung wird der pH-Wert auf den Wert 6,8 eingestellt.

Die Kulturbedingungen sind: 18°C, ein Licht-Dunkel-Wechsel von 14 zu 10 Stunden und eine Lichtintensität von 1000 Lux. Belüftet wird mit steril gefilterter Raumluft.

Unter diesen Bedingungen und unter Beibehaltung eines sieben-tägigen Impfrhythmus stellt sich eine stabile, reproduzierbare

cells / ml

- 149 -

Chlorococcum

Monoraphidium

Nitzschia

Scenedesmus

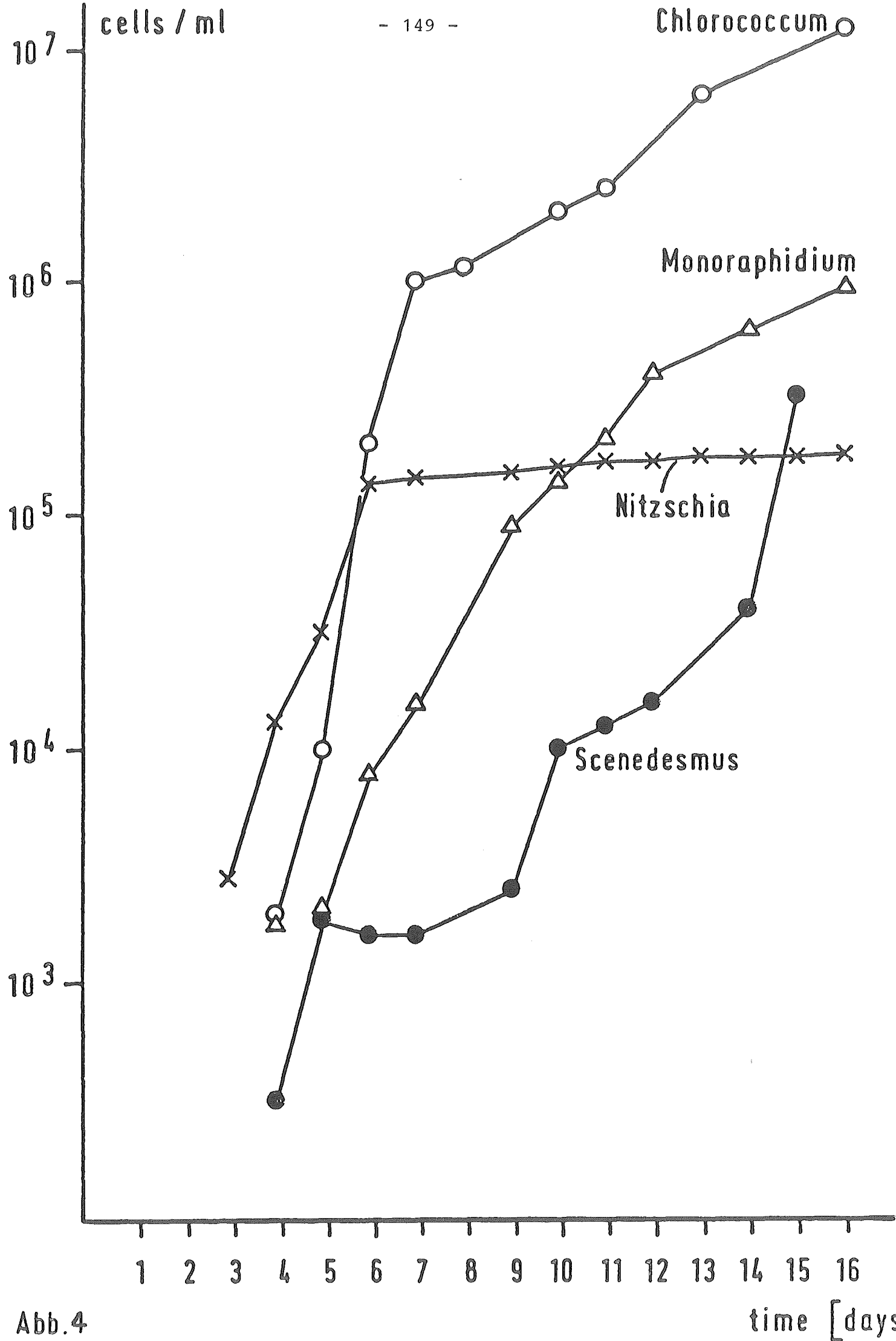


Abb.4

Entwicklung und Sukzession der im System enthaltenen Algen ein. Zuerst kommt Nitzschia palea zwischen dem 4. und 6. Kulturtag in die logarithmische Wachstumsphase, die Entwicklung der Grünalgenarten schließt sich an: Zunächst die von Chlorococcum sp. am 6. Kulturtag, danach die von Monoraphidium falcatus am 10. Tag. Die Entwicklung der Scenedesmus-Arten schließt sich an. Oscillatoria sp. wächst erst nach dem gewählten Versuchszeitraum von 14 Tagen und kann daher für die Toxizitätsuntersuchungen nicht berücksichtigt werden. (Abb. 4)

Die beschriebene sukzessive Artenentwicklung wird nur erreicht, wenn das System als Ganzes weitergeimpft wird. Werden die Organismen aus dem System isoliert und in Reinkulturen überführt, kann durch einfaches Zusammenführen der Einzelglieder das Multi-Spezies-System nicht wieder hergestellt werden. Wir vermuten, daß für die Stabilität des Multi-Spezies-Systems die Begleitorganismen (Bakterien) entscheidend sind und, daß diese beim Isolieren der Algen verlorengehen.

4.2. Durchführung der Toxizitätsuntersuchungen

Für die Bestimmung des Wachstums der Einzelglieder des Multi-Spezies-Systems werden die Algen in einer Thoma-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Parallel zu jeder Versuchsreihe wird eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die phytotoxische Wirkung einer Substanz wird dadurch festgestellt, daß die Wachstumsleistung einer Alge im Versuchsansatz im Vergleich zum Wachstum der gleichen Art in der unbehandelten Kontrolle beschrieben wird. Die Applikation des Schadstoffes erfolgte nach dem Autoklavieren und vor Zugabe der Algen in das Medium aus einer wässrigen Stammlösung. Als Versuchszeitraum wurden 14 bis 16 Tage gewählt. Innerhalb dieser Zeit ist das Wachstum aller für die Toxizitätsuntersuchungen untersuchten Algen abgeschlossen.

Auf ihre phytotoxische Wirksamkeit wurden neben Paraquat (als Methylsulfat) folgende Referenzchemikalien der Fa. Riedel De Haen, Serie "oekanal", untersucht:

Pentachlorphenol, 2-Nitrophenol, 4-Nitrophenol, p-Chloranilin, Anilin, Trichlorbenzol, Atrazin, Phenol und 2,4-D.

4.3. Multi-Spezies-System - Ergebnisse

Die Ergebnisse der im folgenden beschriebenen Experimente wurden in der Regel für jeden Versuch aus drei voneinander unabhängigen Testreihen gemittelt.

4.3.1. Der Einfluß der Referenzchemikalien auf das Wachstumsverhalten des Multi-Spezies-Systems

Paraquat

Gegenüber Paraquat erwies sich Nitzschia palea als die sensi-

tivste Art des Systems. Bereits 0,2 μM bewirkten eine 100%-ige Hemmung. Bei dieser Konzentration war Chlorococcum zu 80% gehemmt. Durch den Ausfall dieser Arten kam es zu einer Massenentwicklung von Monoraphidium falcatus.

Die Zellzahl erreicht das Sechsfache der Kontrolle. Die Scenedesmus-Arten werden im Wachstum nicht beeinflusst. In Gegenwart von 0,04 μM Paraquat (10 $\mu\text{g/L}$) ist nur Nitzschia im Wachstum um durchschnittlich 80% gehemmt. Die Toxizitätsgrenze für Paraquat, bei der die erreichte Zellzahl von Nitzschia deutlich hinter der unbehandelten Kontrolle zurückbleibt, liegt zwischen 0,01 und 0,02 μM (2,5 bis 5 $\mu\text{g/L}$).

Atrazin

Atrazin wirkt nur auf die Grünalgenarten in der Multi-Spezies-Kultur. Chlorococcum und Monoraphidium wachsen in Gegenwart von 1 μM Atrazin nicht. Die Scenedesmus-Arten werden um 90% gehemmt. In Gegenwart von 0,5 μM Atrazin werden Chlorococcum und Monoraphidium beide um 95% gehemmt. Die ermittelte Toxizitätsgrenze liegt bei 0,1 μM (21,5 μg Atrazin/L).

Pentachlorphenol

Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 μM (22 bis 220 $\mu\text{g/L}$) wurden auf ihre Wirksamkeit auf das Multi-Spezies-System überprüft: Deutliche Wachstumsminderungen waren ab 0,5 μM Pentachlorphenol zu beobachten. Die Zellzahl von Scenedesmus quadricauda blieb im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle während des 14-tägigen Versuchszeitraums um 95% reduziert, die von Chlorococcum um 50% und die von Nitzschia um 40%. Monoraphidium und Scenedesmus obliquus wurden durch 0,5 μM Pentachlorphenol nicht gehemmt. In Gegenwart von 1 μM Pentachlorphenol sind die Zellzahlen von Nitzschia und Scenedesmus quadricauda im Vergleich zur Kontrolle um 95% reduziert. Monoraphidium und Scenedesmus obliquus waren nicht gehemmt. Chlorococcum war zu Versuchsbeginn (5. bis 7. Versuchstag) um 40% gehemmt, wuchs danach jedoch stark und erreichte am 13. Versuchstag eine Zellzahl, die der sechsfachen der Kontrolle entsprach. Die Zellzahl von Nitzschia war gegenüber der Kontrolle um 90% bis 95% reduziert.

Eine Sukzession der Grünalgenarten (zuerst das logarithmische Wachstum von Chlorococcum, danach das von Monoraphidium und am Schluß das von Scenedesmus) war nicht mehr zu beobachten. Alle Arten befanden sich zur gleichen Zeit in der logarithmischen Wachstumsphase.

Welche Rolle die Bakterien für die Stabilität der Multi-Species-Kultur spielen, konnte noch nicht geklärt werden. Eine Bestimmung der Bakterienlebendzellzahl in den Kulturen ergab, daß in Gegenwart von 0,5 bzw. 1,0 μM Pentachlorphenol nur noch 2 % der Bakterien überlebten.

4-Nitrophenol

Folgende Konzentrationen wurden auf ihre Wirksamkeit überprüft: 1 μM (139 $\mu\text{g/L}$), 5 μM , 10 μM und 20 μM .

Ein Einfluß auf das Algenwachstum konnte ab 5 μM 4-Nitrophenol (695 $\mu\text{g/L}$) beobachtet werden. Die Zellzahlen von Nitzschia, Chlorococcum, Monoraphidium und Scenedesmus quadricauda waren während der ersten 9 Versuchstage um durchschnittlich 50 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert, die von Scenedesmus obliquus um durchschnittlich 40 %. Nach dem 9. Versuchstag wuchsen die Algen dieses Versuchsansatzes (5 μM) stärker als die der Kontrolle, die prozentuale Hemmung sank nach 14-tägiger Versuchsdauer unter 10 %. Eine mögliche Ursache für die Aufhebung der hemmenden Wirkung von 5 μM 4-Nitrophenol ist eine "Adaptation" der Algen an die eingesetzte Substanz.

In Gegenwart von 10 μM 4-Nitrophenol war Nitzschia um 60 %, Chlorococcum um 80 %, Monoraphidium um 95 % (bis zum 9. Versuchstag), Scenedesmus obliquus um 85 % und Scenedesmus quadricauda um 70 % (bis zum 9. Versuchstag) gegenüber der Kontrolle gehemmt. Nach dem 9. Versuchstag, verringerte sich die prozentuale Hemmung bei Monoraphidium und Scenedesmus quadricauda. Am Versuchsende (nach 14 Tagen) war die Wachstumshemmung bei Monoraphidium auf 10 % gesunken, Scenedesmus

...

quadricauda wuchs stärker als die Kontrolle, und stellte die dominierende Algenart in der Mischkultur dar.

Das starke Wachstum von Scenedesmus quadricauda ist wahrscheinlich auf fehlenden Konkurrenzdruck durch andere Mitglieder der Mischkultur zurückzuführen. Während in Gegenwart von 5 μM 4-Nitrophenol alle Mitglieder des Multi-Species-Systems einen gewissen Gewöhnungseffekt zeigten, war nach Zugabe von 10 μM 4-Nitrophenol dieses Phänomen nur noch bei Monoraphidium und Scenedesmus quadricauda zu beobachten.

In Gegenwart von 20 μM 4-Nitrophenol blieb die Zellzahl von Monoraphidium um 95 % hinter der Kontrolle zurück.

Alle anderen Arten der Mischkultur waren während des gesamten Versuchszeitraumes um durchschnittlich 70 % im Vergleich zur Kontrolle gehemmt.

Nach 14 Tagen war keine Adaptation an die eingesetzte Versuchskonzentration zu beobachten.

p-Chloranilin

Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 μM (63,5 bis 254 $\mu\text{g/L}$) wurden getestet.

0,5 μM p-Chloranilin hemmt alle Algenarten außer Scenedesmus quadricauda und Nitzschia palea um 60 bis 70 % im Vergleich zur Kontrolle. Durch den Ausfall der anderen Mitglieder des Multi-Species-Systems kam es zu einer Massenentwicklung von Scenedesmus quadricauda (bis zur vierfachen Zellzahl der Kontrolle).

In Gegenwart von 1 μM vermehren sich Scenedesmus obliquus und Chlorococcum nicht mehr. Auch bei dieser Konzentration kam es zu einer Massenentwicklung von Scenedesmus quadricauda bis zur vierfachen Zellzahl der Kontrolle. Die Entwicklung von Nitzschia war um 40 %, die von Monoraphidium um 60 % gehemmt. Nach Zugabe von 2 μM p-Chloranilin war Nitzschia um 60 %, Monoraphidium um 80 % im Wachstum gehemmt. Scenedesmus quadricauda erreichte eine Zellzahl von 60 % der Kontrolle.

...

Phenol

Die Wirksamkeit von Phenol wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 μM und 1 mM untersucht. Phenol wirkt erst bei hohen Konzentrationen.

In Gegenwart von 10 μM wird Nitzschia palea in der Entwicklung nicht gehemmt. Bei 20 μM beträgt die durchschnittliche Hemmung 30 %, im Bereich von 50 bis 200 μM bleibt die Hemmung bei 40 - 50 %. Bei noch stärker steigender Phenolkonzentration wird die Hemmung größer - 500 μM bewirken eine Hemmung von 81 %, 1 mM eine von 92 %.

Monoraphidium falcatus zeigt bis zu einer Konzentration von 500 μM keine Hemmung. In Gegenwart von 1 mM tritt eine Reduktion der Zellzahl um 50 % ein. Die Scenedesmus-Arten und Chlorococcum werden bei allen getesteten Konzentrationen im Wachstum nicht gehemmt.

2,4-D

Folgende Konzentrationen wurden auf ihre Wirksamkeit überprüft: 20 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM und 400 μM .

Ein Einfluß auf das Algenwachstum konnte ab 20 μM beobachtet werden. Bei dieser Konzentration wurde bei Monoraphidium falcatus eine Wachstumshemmung von 20 % festgestellt. Scenedesmus obliquus war um 33 % gegenüber der Kontrolle gehemmt. Keine Reduktion der Zellzahl war bei Nitzschia palea und Chlorococcum zu beobachten.

In Gegenwart von 50 μM 2,4-D wachsen die Scenedesmus-Arten nicht mehr. Bei Monoraphidium ist die Zellzahl um 30 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Bei Nitzschia wird eine Wachstumshemmung von 70 % beobachtet. Chlorococcum wächst bei dieser Konzentration besser als in der Kontrolle (139 %). In Gegenwart von 100 μM kommt die Alge zu einer Massentwicklung (493 %). Bei Monoraphidium ist keine Reduktion des Wachstums zu beobachten. Die Scenedesmus-Arten bleiben zu 100 % gehemmt. Die Wachstumshemmung bei Nitzschia beträgt 85 %.

...

In Gegenwart von 200 μ M 2,4-D ist nur noch bei Chlorococcum ein geringes Wachstum zu beobachten (90 %ige Hemmung im Vergleich zur Kontrolle). Alle anderen Glieder des Multi-Species-Systems wachsen nicht mehr.

Anilin

Anilin wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 50 μ M und 1 mM untersucht.

Erste Wachstumsminierungen wurden ab 50 μ M beobachtet. Die Zellzahl von Nitzschia palea ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 30 % reduziert, bei allen anderen Gliedern des Systems ist keine Wachstumsminierung bei dieser Konzentration zu beobachten. Ab 100 μ M Anilin tritt eine Wachstumshemmung auch bei Monoraphidium (30 %ige Hemmung) und Chlorococcum (25 %ige Hemmung) auf. Für Nitzschia beläuft sich die Wachstumsminierung durchschnittlich auf 50 %. Die Scenedesmus-Arten sind in ihrer Entwicklung nicht beeinträchtigt. In Gegenwart von 200 μ M Anilin erreicht die Wachstumsminierung bei Nitzschia 95 %, bei Chlorococcum 46 %, Monoraphidium 66 % und bei beiden Scenedesmus-Arten durchschnittlich 37 %. Die Hemmwirkung wird mit steigender Anilinkonzentration größer. Sie beträgt bei 1mM für Nitzschia 96 %, Chlorococcum 69 %, Monoraphidium 95 % und die Scenedesmus-Arten 72 %

Trichlorbenzol

Konzentrationen zwischen 5 und 100 μ M wurden auf ihre Wirksamkeit überprüft. Unterhalb von 50 μ M war Trichlorbenzol unwirksam. Da höhere Konzentrationen nur unter Einsatz eines Lösungsmittlers hätten geprüft werden können, haben wir auf eine weitergehende Prüfung verzichtet.

...

4.3.2. Langzeitversuche mit sublethalen Wirkstoffkonzentrationen

Das Multi-Species-System wurde einer Dauerbelastung sublethaler Konzentrationen von Pentachlorphenol und p-Chloranilin ausgesetzt. Wie vorne beschrieben, wird bei der Weiterimpfung des Systems ein siebentägiger Impfrythmus eingehalten. In den Versuchen zur Dauerbelastung des Systems mit sublethalen Wirkstoffkonzentrationen wurden sowohl die unbehandelte Kontrolle als auch der Versuchsanatz über mehrere Impfzeiträume weitergeführt und in ihrem Wachstumsverhalten miteinander verglichen. Wie vorne beschrieben, haben wir für Pentachlorphenol deutliche Wachstums-minderungen ab einer Konzentration von 0,5 μM beobachtet. In den Langzeitversuchen wurden deshalb lediglich Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,2 μM eingesetzt.

Für p-Chloranilin wurden deutliche toxische Effekte ab 0,5 μM gemessen. In den Langzeitversuchen wurde deshalb nur eine Konzentration von 0,2 μM getestet.

Dauerversuch mit 0,1 μM Pentachlorphenol

Der Versuch wurde insgesamt über 10 Impfungen durchgeführt. Im Verhalten der Mischkultur bezüglich der Artensukzession und der erreichten Biomassen waren keine Unterschiede zu der unbehandelten Kontrolle festzustellen.

Dauerversuch mit 0,2 μM Pentachlorphenol

Dieser Versuch wurde insgesamt über einen Zeitraum von fünf Impfungen durchgeführt. Wie vorne beschrieben, hatten wir in den Versuchen zur Toxizität von Pentachlorphenol deutliche Wachstums-minderungen ab 0,5 μM registriert:

Scenedesmus quadricauda war um 95 %, Nitzschia um 40 % und Chlorococcum um 50 % gehemmt.

Unter einer Dauerbelastung von 0,2 μM Pentachlorphenol ist Scenedesmus quadricauda bereits nach der zweiten Impfung aus dem System verschwunden. Monoraphidium und Nitzschia zeigen über den gesamten Versuchszeitraum dasselbe Verhalten wie die unbehandelte Kontrolle. Für Chlorococcum ist mit fortschreitender Versuchsdauer (steigende Anzahl der Transfers) eine zunehmende Wachstums-minderung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten: Sie ist während des ersten

...

Versuchs nicht signifikant ($< 15 \%$), beträgt im zweiten 25 %, im dritten 37 %, im vierten 72 % und während des fünften Transfers 73 %.

Die Ergebnisse dieser Versuche belegen, daß auch nicht toxische Konzentrationen einer Substanz unter einer Dauerbelastung wirksam werden können und die Stabilität des Multi-Species-Systems stören. Eine anschließende Weiterführung der Kultur in schadstofffreier Nährlösung führte nicht zu einer Regeneration des Systems.

4.3.3. Dauerversuch mit $0,2 \mu\text{M}$ p-Chloranilin

Die Versuche wurden insgesamt über 10 Transfers durchgeführt, ohne einen Unterschied zur Kontrolle nachweisen zu können.

5. Wertung der Testverfahren

Unsere Ergebnisse belegen, daß die beschriebenen Testverfahren gut geeignet sind, potentielle Gefährdungen aquatischer Systeme, hervorgerufen durch den Einfluß umweltrelevanter Chemikalien auf Primärproduzenten (Algen), auf praktikable Weise anzuzeigen. Im folgenden wird eine Wertung beider Toxizitätsmeßsysteme vorgenommen.

5.1. Screening-Test (Rot-Grün-System)

Der im Vergleich zum Multi-Spezies-System weitaus weniger aufwendige, in der Regel aber unempfindlichere Screening-Test, bietet, aus experimenteller Sicht, gegenüber anderen Methoden der Toxizitätsbestimmung wie Wachstumsmessung oder der Bestimmung der Photosyntheseleistung, eine Reihe von Vorteilen:

a: Für die Versuchsdurchführung steht jederzeit standardisiertes Ausgangsmaterial zur Verfügung, was sonst nur mit großem Aufwand mit synchronen oder homokontinuierlichen Algenkulturen zu erreichen ist. Die Reproduzierbarkeit der

...

Tab. 3: Phytotoxizität verschiedener Umweltchemikalien gemessen mit dem "Rot-Grün-System", dem "Multi-Spezies-System" und dem "Cell Multiplication Inhibition Test" nach BRINGMANN und KÜHN (1980). Es sind diejenigen Konzentrationen angegeben, bei denen erste signifikante Hemmungen auftraten.

WIRKSTOFF	Screening-T.	Lab.Ök.Syst.	Cell Multi.In.T.
Paraquat-ms	0,10 µM	<u>0,02 µM</u>	n.b.
Pentachlorphenol	<u>0,05 µM</u>	0,50 µM	n.b.
Atrazin	0,50 µM	<u>0,10 µM</u>	n.b.
2-Nitrophenol	<u>0,010 mM</u>	<u>0,010 mM</u>	0,031 mM
4-Nitrophenol	0,010 mM	<u>0,005 mM</u>	0,053 mM
4-Chloranilin	0,100 mM	<u>0,50 µM</u>	n.b.
Phenol	2,50 mM	<u>0,020 mM</u>	0,080 mM
Benzol	<u>2,50 mM</u>	n.b.	>18,0 mM
Anilin	2,50 mM	<u>0,050 mM</u>	0,089 mM
Harnstoff	<u>50,00 mM</u>	n.b.	>167,0 mM
Methanol	<u>100,00 mM</u>	n.b.	250,0 mM
2,4-D	>1,00 mM	<u>0,020 mM</u>	n.b.

erhaltenen Ergebnisse ist entsprechend gut (vgl. Tab. 3).

b: Die Bestimmung der Phytotoxizität einer Substanz kann über einen relativ langen Versuchszeitraum (7 Tage) bei einer annähernd gleichen Zelldichte durchgeführt werden. Eine durch Wachstum bedingte Abnahme im Schadstoffgehalt der Algen und des umgebenden Nährmediums, oft Ursache einer Verminderung der zu messenden Toxizität, tritt deshalb nicht auf (vgl. LILLELUND und WEHRMANN 1974, AHLF et al. 1980).

c: Beim wachstumsunabhängigen "Rot-Grün-System" erfolgt die Biosynthese der Chlorophylle schneller als in wachsenden Algenkulturen, so daß exaktere Toxizitätsaussagen innerhalb wesentlich kürzerer Zeiträume möglich sind.

d: Die eigentlichen Toxizitätsmessungen sind sehr einfach, kostengünstig und in kürzester Frist zu erlernen.

e: Der beschriebene Screening-Test ist außerdem universell einsetzbar. Durch die Möglichkeit in gasdicht verschlossenen Kulturgefäßen zu arbeiten, können auch leicht flüchtige Substanzen in definierter Konzentration untersucht werden.

Neben den aufgeführten Vorteilen ist ein wesentliches Kriterium für die Brauchbarkeit eines Screening-Tests die Sensitivität gegenüber einer möglichst großen Anzahl toxisch wirkender Umweltchemikalien. Tab. 3 zeigt, daß das "Rot-Grün-System" auf Zugaben von Umweltchemikalien z.T. deutlich unempfindlicher reagiert als das "Multi-Spezies-System", im Vergleich zum "Cell Multiplication Inhibition Test" von BRINGMANN und KÜHN (1980) jedoch durchschnittlich eine wenigstens gleich hohe Empfindlichkeit aufweist. Die Zusammenstellung in Tab. 3 belegt weiterhin, daß die Phytotoxizität einer Substanz mit einem Toxizitätsmeßsystem allein nicht ausreichend beurteilt werden kann. Erst aus dem Vergleich mehrerer Testsysteme läßt sich eine genauere Klassifizierung von Chemikalien nach ihrer Giftigkeit ableiten.

...

5.2. Multi-Spezies-System

Das Multi-Spezies-System ist im Vergleich zum Screening-Test aufwendiger: Es muß regelmäßig weitergeführt werden und eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle ist unabdingbar.

Das System ist nur in belüfteter Kultur reproduzierbar, so daß Untersuchungen mit flüchtigen Substanzen nur schwer durchgeführt werden können. Die in Tab. 3 dargestellten phytotoxischen Grenzkonzentrationen zeigen aber, daß das Multi-Spezies-System im Vergleich zum Rot-Grün-Test und zum "Cell Multiplication Inhibition Test" von BRINGMANN und KÜHNE (1980) empfindlicher ist (eine Ausnahme macht lediglich Pentachlorphenol).

In klassischen Toxizitätstests werden Organismen einer einzigen Art eingesetzt und die Wirkung einer Substanz mit einfachen Parametern beschrieben (z.B. dem Absterben der Organismen). Will man aber untersuchen, wie sich eine Substanz auf ein Ökosystem auswirkt, so können die Ergebnisse, die mit herkömmlichen Toxizitätstests erzielt werden, nur erste Anhaltspunkte liefern. Für Ökosystem-Toxizitäts-Messungen stellt deshalb das von uns entwickelte Multi-Spezies-System eine deutliche Verbesserung dar.

Insgesamt sind wir der Meinung, daß sowohl der Screening-Test als auch das Multi-Spezies-System geeignet sind, als standardisierte Meßverfahren zur Beurteilung der Wirkung von Chemikalien in aquatischen Ökosystemen beizutragen.

LITERATUR*

- AHLF, W., IRMER, U., WEBER, A. (1980): Über die Anreicherung von Blei durch Süßwassergrünalgen unter Berücksichtigung verschiedener Außenfaktoren. - Z. Pflanzenphysiol. 100, 197 - 207.
- BEDNARZ, T.: The effect of 2,4-D acid on green and blue-green algae in unialgal and mixed cultures. Acta Hydrobiol. 23, 173 - 182 (1981).
- BRINGMANN, G., KÜHN, R. (1980): Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to Bacteria, Algae, and Protozoa in the Cell Multiplication Inhibition Test. - Water Res. 14, 231 - 241.
- IWAMURA, T., NAGAT, H., ICHIMURA, S. (1970): Improved methods for determining contents of chlorophyll, protein, ribonucleic acid, and desoxyribonucleic acid in planktonic populations. - Int. Revue Ges. Hydrobiol. 55 (1), 131-147.
- KESSLER, E., CZYGAN, F.-C. (1970): Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. VI. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen. - Arch. Mikrobiol. 70, 211 - 216.
- LILLELUND, K., WEHRMANN, L. (1974): Akkumulationsversuche von Lindan in einer Kultur von Dunaliella spec. zur Standardisierung eines Algentests. - Berichte der Deutschen Wissenschaftlichen Kommission für Meeresforschung 23 (3), 317 - 325.
- MALY, M., RUBER, E.: Effects of pesticides on pure and mixed species cultures of salt marsh pool algae. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 30, 464 - 472 (1983).

* Weitere Literaturangaben in den von uns im Rahmen dieses Projektes erstellten Veröffentlichungen.

MORELAND, D. E. (1980): Mechanisms of Action of Herbicides. -
Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 597 - 638.

SCHERF, H. (1981): Die Salzlast der Werra. - Naturwissen-
schaftliche Rdsch. 34 (9), 389 - 390.

SCHULZ, H. (1961): Qualitative und quantitative Plankton-
untersuchungen im Elbe-Aestuar. - Arch. Hydrobiol.,
Suppl. XXVI (1/2), 5 - 105.

WEBER, A. (1981): An uncomplicated screening test to
evaluate toxicity of environmentally hazardous compounds
in water. - Environm. Technol. Letters 2, 323 - 328.

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (O3 7248)

Wasserpflanzen und aquatische Nahrungsketten als
Testobjekte für die Ermittlung der ökotoxikologischen
Wirkung von Chemikalien

von

Dr. A. Melzer

Institut für Botanik und Mikrobiologie
der Technischen Universität München

Institutsleiter:
Prof. Dr. H. Ziegler

und

Prof. Dr. W. Huber

Institut für Botanik
der Technischen Universität München,
Freising-Weihenstephan

Institutsleiter:
Prof. Dr. B. Hock

Mai 1983

Zusammenfassung

Bei verschiedenen Lemnaceen (Sterilkulturen von: *Lemna gibba*, *L. minor*, *L. minuscula*, *L. turionifera*, *Spirodela polyrrhiza* und *Sp. punctata*) konnte unter dem Einfluß von PCP eine starke und rasch eintretende Inhibierung der in vivo-Nitritreduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Die in vivo-Nitratreduktase-Aktivität blieb im gleichen Konzentrationsbereich dagegen nahezu unbeeinflusst.

Als Folge dieser Reaktionen stellte sich eine Nitritfreisetzung ins Kulturmedium ein. Eine Nitritakkumulation im Pflanzengewebe war nicht feststellbar. Zwischen den Arten kam es zu auffälligen quantitativen Unterschieden in der Nitritfreisetzung. Bei einer Behandlung mit Atrazin; 2,4-D; 2-Nitrophenol; 4-Nitrophenol und HgCl_2 konnte dagegen keine signifikante Nitritfreisetzung im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden.

Das Wachstum der sechs untersuchten Lemnaceen wurde durch diese Chemikalien sowie PCP stark beeinflusst. Das Reaktionsmuster der Arten gegenüber der gleichen Chemikalie glich sich dabei z.T. nur wenig.

Die Wirkung gasförmig applizierter Chemikalien (PCP, Äthylen) auf das Wachstum, die Nettphotosyntheserate sowie die Aktivität verschiedener Enzyme wurde bei *Lemna minor* sowie den beiden amphibischen Wasserpflanzen *Nasturtium officinale* und *Veronica beccabunga* untersucht. Deutliche, wenn auch wenig spezifische Reaktionen konnten erst bei sehr hohen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die Akkumulation von PCP wurde bei 33 verschiedenen makrophytischen Wasserpflanzen aus Hart- und Weichwasserbiotopen ermittelt. Weder zwischen systematisch verwandten Arten noch zwischen solchen mit ähnlichen Standortansprüchen konnten einheitliche Akkumulationsmuster festgestellt werden. An ausgewählten Arten wurde zusätzlich der Einfluß verschiedener Parameter, nämlich pH-Wert, Licht, Jahreszeit, Inkubationsdauer und Fettgehalt auf die PCP-Akkumulation ermittelt, ebenso der Transport von PCP innerhalb von Pflanzen.

Untersucht wurde auch die PCP-Akkumulation bei phytophagen Tieren (vor allem bei *Gammarus roeselii*). Durchschnittlich waren 90 %

des aufgenommenen PCP's in der Rohfettfraktion enthalten. Mit jahreszeitlichen Schwankungen des Rohfettgehaltes änderte sich auch die PCP-Akkumulation. Eine PCP-Anreicherung in der Nahrungskette (Wasserpflanze/Gammariden) konnte nicht nachgewiesen werden.

Um die Laborexperimente unter naturnahen Bedingungen kontrollieren zu können, wurden im Freiland Modellökosysteme (3 Becken mit den Ausmaßen 400x100x90 cm) installiert. Die Becken wurden mit ausgewählten Makrophyten bepflanzt. Mit dem Sediment wurden Bakterien, Tiere und Algen eingebracht. Seit etwa 20 Monaten befinden sich die Modellökosysteme in einer Stabilisierungsphase, in der die Entwicklung des Wasserchemismus, des Phyto- und Zooplanktons sowie des Makrophytenbestandes kontinuierlich beobachtet wird. Die Modellökosysteme entwickeln sich weitgehend parallel, hin zu nährstoff- und produktionsarmen Kleingewässern. Die Auswirkung zu testender Chemikalien auf die Modellökosysteme wird in einem Folgeprojekt ermittelt.

Summary

In various Lemnaceae (sterile cultures of *Lemna gibba*, *L. minor*, *L. minuscula*, *L. turionifera*, *Spirodela polyrrhiza* and *Sp. punctata*) the in vivo nitrite reductase activity was strongly and rapidly inhibited by PCP. By contrast, the activity of in vivo nitrate reductase remained or less unaffected.

As a result of these reactions, nitrite was released into the culture medium. An accumulation of nitrite in plant tissue did not occur. There were marked quantitative differences in nitrite release between the various species. However, following treatment with atrazine, 2,4-D, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol and HgCl_2 , no significant differences in nitrite release were observed with respect to the control.

The growth of the six Lemnaceae studied was strongly affected by these chemicals as well as by PCP. The responses of the species to the same chemical often did not be similar.

The effects of gaseously applied chemicals (PCP, ethylene) on growth, net photosynthetic rates and various enzyme activities were studied in *Lemna minor* and the amphibious water-plants,

Nasturtium officinale and *Veronica beccabunga*. Significant although relatively unspecific effects were only observable with very high concentrations.

The accumulation of PCP was determined in 33 different macrophytic water-plants of both hard and soft water types. No uniform accumulation pattern was observed either in systematically related species or in plants from the same location. Additionally, in certain selected species, the effects of pH, light, season, incubation time and fat content on PCP accumulation were determined, as well as the transport of PCP with the plants.

A study was also made of PCP accumulation by herbivorous animals (especially *Gammarus roeselii*). On average, the crude fat extract contained 90 % of the PCP taken up. The PCP accumulation changed in parallel with the seasonal variations in the crude fat content. An enrichment of PCP in the food chain (water-plants/gammarids) was not observed.

In order to perform the laboratory experiments under more natural, but controlled conditions, model ecosystems (3 containers, 400x100x90 cm in size) were set up in the open. The containers were filled with selected macrophytes. Bacteria, animals and algae were present in the sediment. For 20 month, these model ecosystems have been in a stabilisation phase, during which the development of chemical changes of the water, phyto- and zooplankton populations and macrophyte growth have been continuously monitored. The model ecosystems have developed in a parallel manner to nutrient- and production-poor ponds. The effect of the chemicals of interest on the model ecosystems will be determined in a following project.

1. Einleitung

Makrophytische Wasserpflanzen wurden bisher als Objekte ökotoxikologischer Tests vergleichsweise selten eingesetzt. Vor allem physiologische Leistungen, wie z.B. Enzymreaktionen wurden kaum als Bewertungskriterien für die Wirkung von Umweltchemikalien herangezogen. Lediglich die Beeinflussung der Nettophotosyntheserate verschiedener makrophytischer Wasserpflanzen durch steigende Konzentrationen von Schwermetallen und Tensiden hatten Kohler und seine Arbeitsgruppe intensiv untersucht (z.B. Kohler, 1976; Schuster et al., 1977). Besondere Gründe für die Wahl makrophytischer Wasserpflanzen als Testobjekte ökotoxikologischer Tests waren jedoch, der im Vergleich zu Landpflanzen besonders enge Kontakt mit der (im Wasser gelösten) Chemikalie und die Möglichkeit die Pflanzen problemlos ohne festes Substrat aufziehen und damit Wechselwirkungen zwischen Chemikalie und Bodenpartikeln umgehen zu können. Darüberhinaus war es möglich, unter den zur Verfügung stehenden heimischen Wasserpflanzenarten solche mit ganz verschiedenen Empfindlichkeiten gegenüber anthropogenen Belastungen auszuwählen, sowie solche, die abweichende Wuchsformen aufweisen (submerse, emerse, amphibische, pleustische Arten, Schwimmblattpflanzen, wurzelnde, nicht wurzelnde Arten). Weil zudem nur wenige Wassertiere unzersetzte Wasserpflanzen verwerten können, bot sich diese Produzenten/Konsumenten-Beziehung als geeignet an, in die Untersuchungen einbezogen zu werden.

Unser Untersuchungsprogramm gliederte sich letztlich in folgende Teile: a) Individualtests mit makrophytischen Wasserpflanzen, wobei einerseits im Wasser gelöste und andererseits gasförmig

applizierte Chemikalien eingesetzt wurden, b) Nahrungskettentests, bei denen die Ermittlung des Akkumulationsverhalten verschiedener Wasserpflanzenarten sowie phytophager Tiere im Vordergrund stand und c) Modellökosystemstudien, die eine Synthese und Ergänzung der beiden erstgenannten Stufen darstellen sollten.

Mit der Einbeziehung solcher Modellökosysteme, die im Freiland angelegt wurden, sollte die in der Projektausschreibung geforderte Übertragbarkeit der im Labor gewonnenen Ergebnisse auf natürliche Verhältnisse erreicht werden. Solche Freiland-Modellökosysteme müssen einige Voraussetzungen erfüllen:

- Es sollten verschiedene Trophieebenen im System vorhanden sein (Menzel u. Case, 1977)
- Das System sollte in der Lage sein, sich über einen längeren Zeitraum selbst am Leben zu erhalten. Dies verlangt ausreichende Mineralisation, intakte Nährstoffkreisläufe und ein kontinuierliches Überleben der Arten (Dortland, 1980). Weiter sollte das System solange lebensfähig sein, daß Änderungen in den biologischen Lebenscyclen sowie jahreszeitliche Veränderungen der Populationen erfaßt werden können. Diese verlaufen normalerweise sehr langsam, besonders in Gegenwart subletaler Dosen von toxischen Chemikalien.
- Das System muß genügend groß sein, damit eine ausreichende Diversität der Arten gegeben ist. Außerdem sollte das System durch die regelmäßige Entnahme von Wasser oder biologischen Proben nicht zu sehr gestört werden.
- Das System muß so ausgelegt sein, daß zwischen natürlichen Veränderungen (z.B. durch das Klima) und durch toxische

Chemikalien herbeigeführte Veränderungen unterschieden werden kann (Dortland, 1980).

Besonders die letzte Forderung macht deutlich, daß eine Stabilisierungsphase der MES unabdingbar notwendig ist, in der die abiotischen Faktoren und die Biozönose ohne Schadstoffbelastung regelmäßig untersucht werden. Weiterhin ergibt sich daraus die Forderung, daß während der Schadstoffbelastung in jedem belasteten Becken ein Kontrollkompartiment vorgesehen werden muß, welches mit dem Verhalten des Gesamtsystems in der Stabilisierungsphase verglichen werden kann. Aus beiden Forderungen ergibt sich automatisch, daß Laborökosysteme für solche Untersuchungen nicht geeignet sind. Dazu sind Freilandmodellökosysteme notwendig, wie in einigen Untersuchungen schon deutlich gemacht wurde (Menzel u. Case, 1977; Dortland, 1980; Kuiper, 1981).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollten zunächst einmal Modellökosysteme installiert und ihre Gleichgewichtseinstellung verfolgt werden. Dabei sollte die populationsdynamische Entwicklung der Mikro- und Makroflora, der Fauna sowie die Messungen der abiotischen Faktoren im Vordergrund stehen. In einem zweiten Untersuchungsabschnitt - auf den hier nicht eingegangen werden soll - werden dann umweltrelevante Schadstoffe appliziert und ihre Wirkungen auf das Ökosystem untersucht. Nach Ende des zweiten Untersuchungsabschnitts (neues Projekt) soll dann die Eignung der MES zur Beurteilung von Schadstoffen bewertet werden.

2. Die Wirkung von im Wasser gelösten Testsubstanzen auf makrophytische Wasserpflanzen

2.1. Material und Methoden

Testobjekte für diese Versuche waren Sterilkulturen folgender Lemnaceen: *Spirodela polyrrhiza*, *Sp. punctata*, *Lemna minor*, *L. gibba*, *L. minuscula* und *L. turionifera*. Die Kulturen wurden uns freundlicherweise von Prof.Dr.E.Landolt, Geobot. Inst. "Rübel" der ETH Zürich überlassen. Das Nährmedium hatte die bei Erismann (zit. in Bauer et al. 1976) beschriebene Zusammensetzung. Nur wurde Stickstoff ausschließlich in Form von Nitrat (0,2 mM) zugesetzt. Als Testgefäße wurden 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit je 100 ml Nährmedium benutzt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte bei 25°C im Dauerlicht (1500 Lux) unter statischen Bedingungen. Die Bestimmung der in vivo-Nitratreduktase-Aktivität wurde nach Jaworski (1971), die der Nitritreduktase-Aktivität nach Ferrari und Varner (1971) durchgeführt. Zur Untersuchung der Nitritfreisetzung ins Medium wurden frisch umgesetzte Lemnen 2-3 Tage angezogen, bevor die Zugabe der Chemikalie und die anschließende 24-stündige Dunkelinkubation erfolgte. Das Wachstum wurde durch Zählung der Sprossglieder bestimmt. Als Testsubstanzen wurden bei diesen Versuchen eingesetzt: PCP; 2,4-D; 2-Nitrophenol; 4-Nitrophenol, Atrazin und HgCl_2 .

2.2. Stickstoffmetabolismus

Bei verschiedenen makrophytischen Fließwasserpflanzen zeigte sich unter dem Einfluß von PCP eine Steigerung der in vivo-Nitratreduktase-Aktivität (NRA). Da bei diesen Freilandpflanzen jedoch starke Schwankungen der Meßergebnisse sowie jahreszeitliche Veränderungen der Aktivitäten auftraten, die deren Eignung als Objekte standardisierbarer Tests stark einschränkte, konzentrierten

sich entsprechende Untersuchungen auf Sterilkulturen verschiedener Lemnaceen. Bei diesen Lemnaceen zeigte sich nur eine geringe, oft sogar fehlende Aktivitäts-Förderung des Enzyms bei einer PCP-Belastung zwischen 0,5 und 5 ppm. Im gleichen Konzentrationsbereich war dagegen eine starke Hemmung der Nitritreduktase-Aktivität (NiRA) festzustellen. Diese trat zudem sehr rasch ein und zwar sowohl bei Zugabe von PCP zum Kulturmedium (2 h Einwirkzeit, danach 1/2 h Inkubation im NiR-Puffer) als auch bei direkter Zugabe zum Inkubationspuffer (gleiche Inkubationszeit). Für *Spirodela punctata* ist die Konzentrationsabhängigkeit dieser beiden Versuchsvarianten in Abb. 1. wiedergegeben.

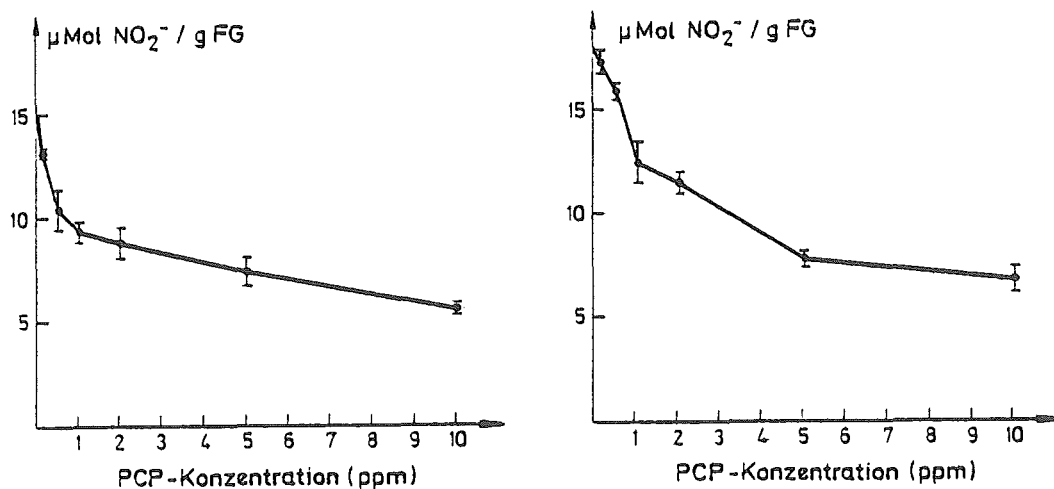


Abb. 1: Wirkung verschiedener PCP-Konzentrationen auf die in vivo-Nitritreduktase-Aktivität von *Spirodela punctata*.

links: PCP Zugabe direkt zum in vivo-Inkubationspuffer. Inkubationszeit: 30 min.

rechts: PCP-Zugabe zum Kulturmedium, 2 h Einwirkzeit, danach 30 min Inkubation im in vivo-Inkubationspuffer

Wenn aber die NR in ihrer Aktivität durch PCP unbeeinflusst bleibt, oder sogar leicht gefördert wird, die NiRA gleichzeitig

deutlich inhibiert wird, müßte sich Nitrit in den Pflanzen akkumulieren. Bei Landpflanzen konnte ein entsprechender Effekt nachgewiesen werden (Klepper, 1974). Bei den von uns untersuchten Wasserpflanzen war jedoch in keinem Fall eine Nitritanreicherung zu ermitteln, die bei Landpflanzen als eine sekundäre Giftwirkung angesehen wird (Klepper, 1976). Wie wir feststellten, geben Wasserpflanzen das gebildete Nitrit an das Kulturmedium ab und umgehen dadurch eine Selbstvergiftung. Die von uns zuerst bei *Spirodela polyrrhiza* beobachtete NO_2 -Akkumulation im Kulturmedium wurde daraufhin bei den übrigen 5 Lemnaceen-Arten hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von der eingesetzten PCP-Konzentration (Kontrolle und acht verschiedene Konzentrationen zwischen 0,2 und 10 ppm) untersucht. Es ergaben sich bei diesen Tests auffällige und signifikante Unterschiede zwischen den Arten (Abb. 2).

Einerseits besteht keine Übereinstimmung in den Konzentrationen, die die höchste Nitritfreisetzung verursachten, vor allem aber ist eine deutliche quantitative Abweichung der pro g FG innerhalb von 24 h ins Medium abgegebenen NO_2 -Menge zu verzeichnen. Die höchste Nitritakkumulation im Nährmedium konnte bei *Lemna turionifera* beobachtet werden, diese blieb zudem über einen relativ weiten Konzentrationsbereich gleich. Ebenfalls eine hohe Nitritfreisetzung, jedoch mit einem scharfen Maximum bei PCP-Konzentrationen von nur 0,5 ppm, wies *Lemna minuscula* und etwas weniger deutlich ausgeprägt auch *Spirodela polyrrhiza* auf. Bei *Spirodela punctata* wurde die höchste Nitritfreisetzung erst bei 3ppm PCP erreicht und sie blieb dann bis 10 ppm nahezu gleich. Quantitativ wenig bedeutsam war die Nitritfreisetzung bei *Lemna gibba* und statistisch nicht abzusichern bei *Lemna*

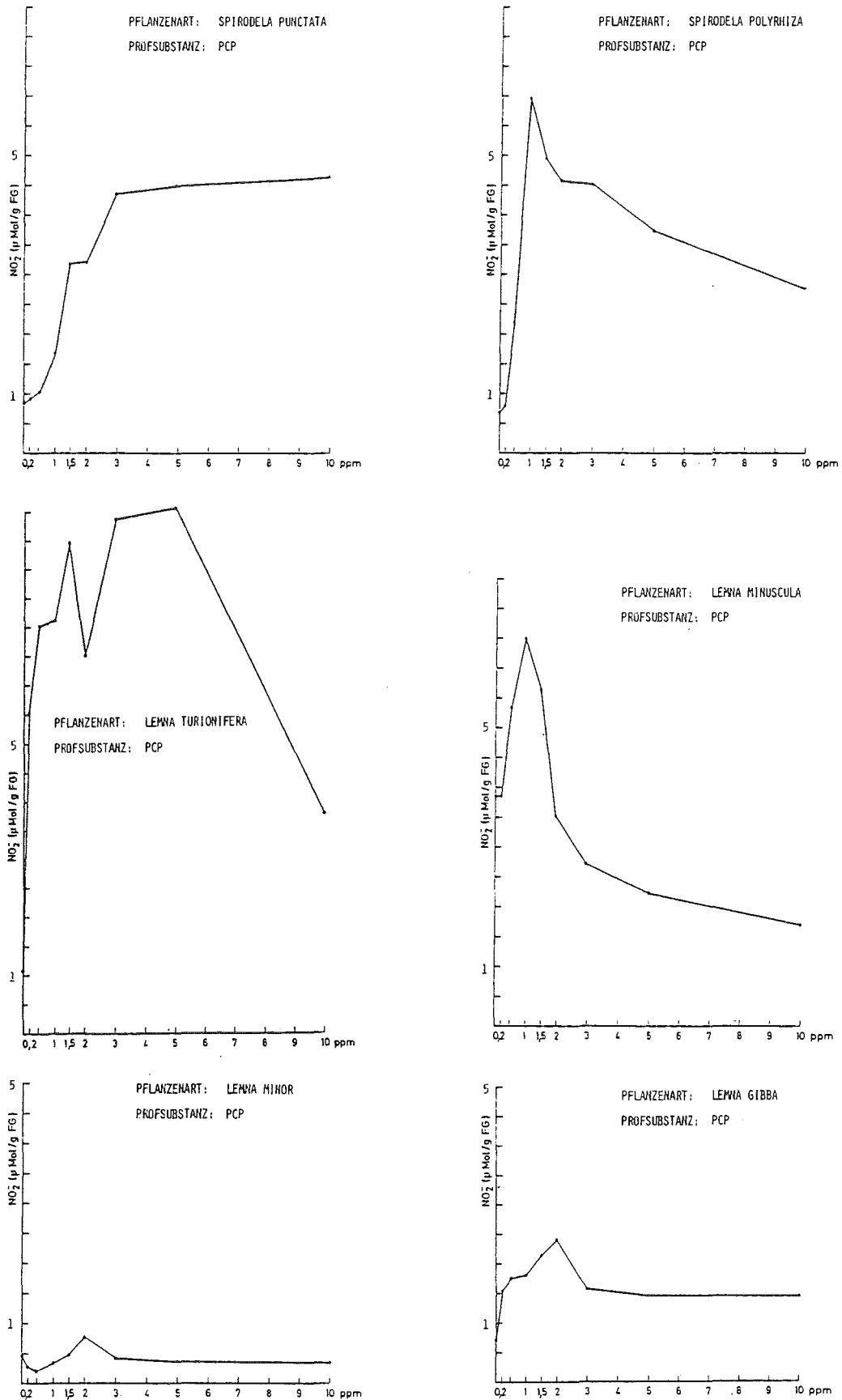


Abb. 2: Nitritfreisetzung verschiedener Lemna-Arten unter dem Einfluß steigender PCP-Konzentrationen (Inkubation: 24h Dauerdunkel)

minor. Überraschenderweise scheint PCP nur bei dieser Wasserlinsen-Art nicht in den Nitratmetabolismus durch eine Inhibition der NiRA einzugreifen.

Bestätigt wurde die Unempfindlichkeit von *Lemna minor* gegenüber PCP auch noch dadurch, daß ganz im Gegensatz zu den anderen Lemnaceen nur bei dieser Art das Wachstum bei den bis 2,5 ppm getesteten Konzentrationen nahezu unbeeinflußt blieb.

Um zu ermitteln, ob die beobachtete Nitritfreisetzung eine spezifische Reaktion von PCP ist, wurden 5 andere Chemikalien, nämlich Atrazin; 2-Nitrophenol; 4-Nitrophenol; 2,4-D und HgCl_2 im gleichen Konzentrationsbereich wie PCP (acht verschiedene Konzentrationen zwischen 0,2 und 10 ppm) getestet. Versuchspflanze war dabei *Spirodela polyrrhiza*, da sie einerseits am leichtesten zu kultivieren war und sich andererseits bei den Wachstumskurven als besonders empfindlich erwies. Bei keiner der zusätzlich untersuchten Chemikalien konnte nach 24 h Dunkelinkubation eine signifikant höhere Nitritmenge im Kulturmedium nachgewiesen werden als sich in dieser Zeit auch bei den Kontrollen akkumulierte.

2.3. Wachstum

Mit allen sechs uns zur Verfügung stehenden Lemnaceen und den sechs weiter oben genannten Chemikalien wurde auch die Wachstumsbeeinflussung in Abhängigkeit von der Konzentration ermittelt. Eine Darstellung aller Ergebnisse kann an dieser Stelle nicht erfolgen, sie werden gesondert publiziert (Melzer und Weber, in Vorb.). Auffällig an den Wachstumskurven war wiederum ein stark variierendes Verhalten der verschiedenen Lemnaceen gegenüber der gleichen Chemikalie, das ja schon bei der durch PCP induzierten NO_2 -Freisetzung zu beobachten war. Beispielhaft

sei hier die Reaktion von 3 Lemnaceen gegenüber 4-Nitrophenol wiedergegeben (Abb. 3).

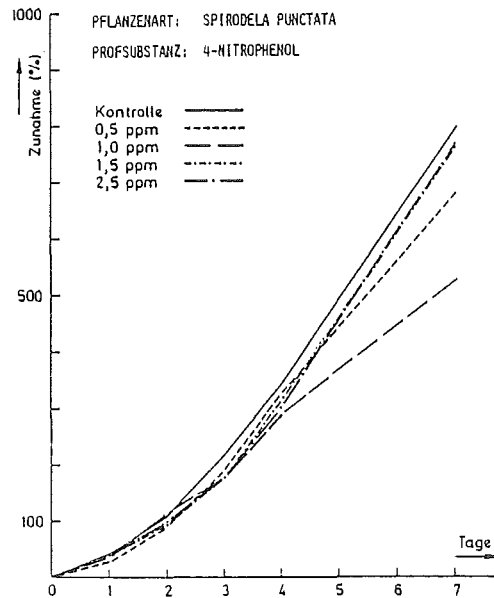
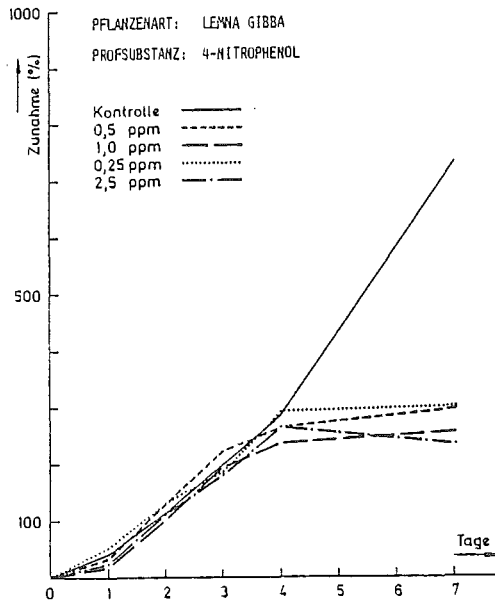
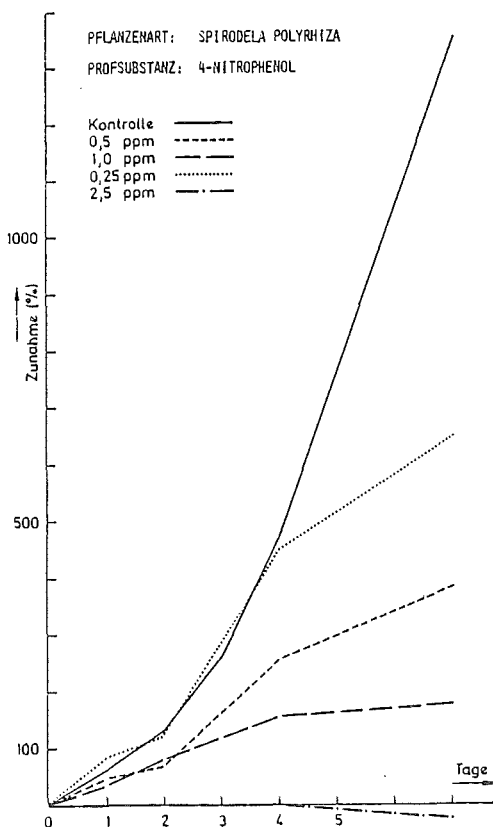


Abb.3: Beeinflussung des Wachstums von *Lemna gibba*, *Spirodela punctata* und *Spirodela polyrrhiza* durch steigende PCP-Konzentrationen



4-Nitrophenol hemmt das Wachstum von *Spirodela polyrrhiza* deutlich und zwar bei 0,25 ppm innerhalb von 7 Tagen um die Hälfte. Liegt eine zehnfach höhere Konzentration vor, unterbleibt die vegetative Sprossung der Pflanzen völlig. Bei *Spirodela punctata* bewirkte die höchste getestete Konzentration von 2,5 ppm nach derselben Zeit nur eine Wachstumshemmung von ca. 30%, die übrigen Konzentrationen von 0,5; 1,0 und 1,5 ppm blieben annähernd ohne Wirkung. Ganz anders schließlich noch das Verhalten von *Lemna gibba*: bis zum 4. Tag ergibt sich kein Unterschied zwischen 0,25; 0,5 u. 1,0 ppm gegenüber der Kontrolle. Dann stellt sich das Wachstum bei allen mit 4-Nitrophenol behandelten Proben, unabhängig von der Konzentration, plötzlich ein.

2.4. Übersicht und Bedeutung der Ergebnisse

In der ersten Phase unseres Programms wurde die Beeinflussung der physiologischen Leistung verschiedener Fließwassermakrophyten durch im Wasser gelöstes PCP in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht. Über diese Experimente soll hier nicht berichtet werden, da aus der starken jahreszeitlichen Schwankung der Grundaktivität eine geringe Eignung der Pflanzen als Objekte von Standardtests resultierte. Durch die Umstellung der Experimente auf Sterilkulturen von Lemnaceen wurde diese Schwierigkeit umgangen. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß mit den dabei gewonnenen Ergebnissen nicht mehr auf das Verhalten der Pflanzen unter natürlichen Standortverhältnissen geschlossen werden kann.

Den Stickstoffmetabolismus der Lemnaceen stellen wird deshalb in den Mittelpunkt unserer Untersuchungen, weil sich bei den Fließwassermakrophyten hier deutliche Hinweise auf eine Beein-

flussung durch PCP ergeben hatten. Zwei Tests bieten sich in diesem Zusammenhang als geeignete Standardtests zur raschen Ermittlung der Wirkung von Chemikalien an. Zum einen der in vivo - Nitritreduktase Test, bei dem eine Beeinflussung durch PCP z.B. bereits nach 20 min feststellbar war (Melzer u. Roth, in Vorb.) und zum anderen die von uns erstmals beobachtete Nitritfreisetzung von Lemnaceen ins Kulturmedium (Melzer und Weber, in Vorb.) , die bei den sechs getesteten Chemikalien nur bei PCP auftrat. Ob tatsächlich eine Wirkungsspezifität für PCP gegeben ist, konnte verständlicherweise nicht ermittelt werden. Da jedoch eine überraschende artspezifische Abweichung der Nitritfreisetzung vorliegt, ist zu vermuten, daß das Muster der Reaktion bei den sechs verschiedenen Lemnaceen niemals das gleiche sein wird. Ganz ähnliches wird vermutlich auch für die Wachstumsbeeinflussung der Lemnen gelten. Es ist zwar durchaus zu erwarten, daß eine Art durch verschiedene Chemikalien in ihrem Wachstum ähnlich beeinflußt wird, das Muster aller Arten dürfte aber kaum je übereinstimmen.

Da die Versuche statisch angelegt waren, muß trotz der Einheitlichkeit des sich rein vegetativ vermehrenden Pflanzenmaterials und der sterilen Aufzuchtbedingungen mit z.T. sehr starken Wachstumsschwankungen zwischen Wiederholungsversuchen gerechnet werden. Der Hauptgrund dafür liegt in der unterschiedlichen momentanen Wüchsigkeit der zum Animpfen benutzten Stammkultur. Es ist schwierig, jeweils einheitlich wüchsiges Anzuchtmaterial anzuziehen. Die Parallelen innerhalb eines Versuches sind dagegen sehr gut.

3. Die Wirkung gasförmig applizierter Testsubstanzen auf makrophytische Wasserpflanzen

3.1. Material und Methoden

Als Versuchspflanzen wurden *Lemna minor*, *Nasturtium officinale* und *Veronica beccabunga* verwendet. Die Anzucht der Pflanzen sowie sämtliche Testmethoden sind bei Huber et al. (1982) und bei Schubert (in Vorbereitung) ausführlich beschrieben. Aus der Vielzahl der durchgeführten Experimente seien exemplarisch einige Ergebnisse herausgegriffen.

3.2. PCP-Wirkungen

3.2.1. Einfluß auf das Wachstum

Das Wachstum der Lemnen wurde durch die erreichbaren PCP-Konzentrationen im Gasraum gefördert (Abb. 4).

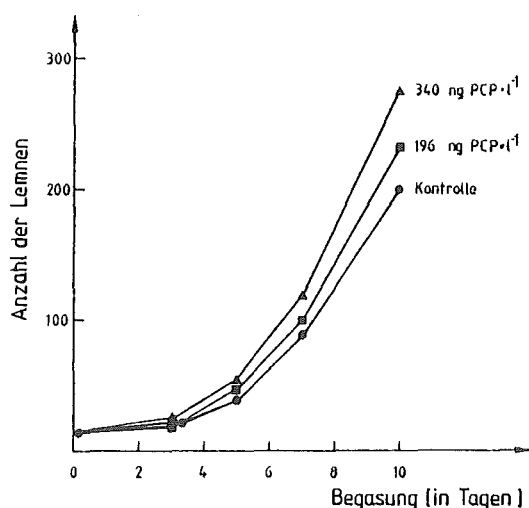


Abb.4: Wirkung einer PCP-Langzeitbegasung auf das Wachstum (Vermehrung) von *Lemna minor*. Es wurden zu Beginn des Experiments 10 Lemna-Pflanzen in die Küvetten gebracht und kontinuierlich begast. Die Abbildung gibt die unterschiedlichen Vermehrungsraten wieder.

Dieser Befund ist vergleichbar mit NaCl- oder Trockenstreß, wo geringe Streßstärken oder kurze Streßeinwirkungszeiten ebenfalls zu Wachstumssteigerungen führten (Huber, 1975).

3.2.2. Einfluß auf die Photosynthese

Die photosynthetische O₂-Produktion sinkt nach 60 stündiger Begasung mit 340 ngPCP · l⁻¹ um ca. 40% ab. Weitere Begasung über

einen Zeitraum von 7 Tage hatte keine zusätzliche Wirkung mehr (Abb. 5).

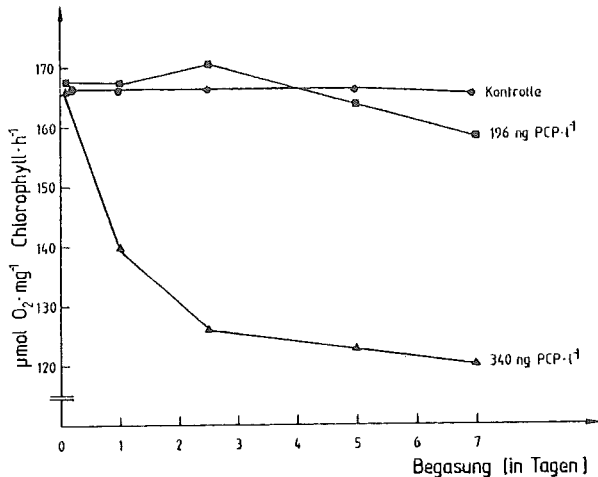


Abb.5: Wirkung von gasförmigem PCP auf die Photosynthese von *Lemna minor*. Das PCP wurde dabei kontinuierlich durch die Inkubationsküvetten gepumpt. Gemessen wurde die photosynthetische O₂-Produktion mit einer Clark-Elektrode.

Eine Reduktion der Photosynthese mit steigender PCP-Konzentration wurde auch bei Applikation des PCPs in die Nährlösung gefunden (Huber et al., 1982). Die Wirkung der niedrigen PCP-Konzentrationen steht allerdings im Gegensatz zu Befunden von Lien & San Pietro (1979). Sie konnten an der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* zeigen, daß die Phenazetinmethosulfat (PMS) - abhängige Photophosphorylierung bis zu 2,5 mg PCP · l⁻¹ nicht beeinflußt wird. Dieser Widerspruch ist entweder auf das unterschiedliche Pflanzenmaterial zurückzuführen oder auf die verwendeten Meßverfahren. Während Lien & San Pietro nur die Photophosphorylierung untersucht haben, haben wir die Netto-Photosynthese gemessen, die offensichtlich viel sensitiver gegenüber PCP reagiert. Dieser Verdacht wird durch andere von uns durchgeführten Untersuchungen gestützt. Es konnte gezeigt werden, daß auch die Photosynthese von *Elodea canadensis* L. bei PCP-Konzentrationen kleiner 2,5 mg/l stark gehemmt wird.

3.2.3. Einfluß auf Enzymaktivitäten

Die Auswirkungen einer PCP-Begasung auf Enzyme von *Lemna minor* seien am Beispiel der Nitratreduktase erläutert. Die Aktivität

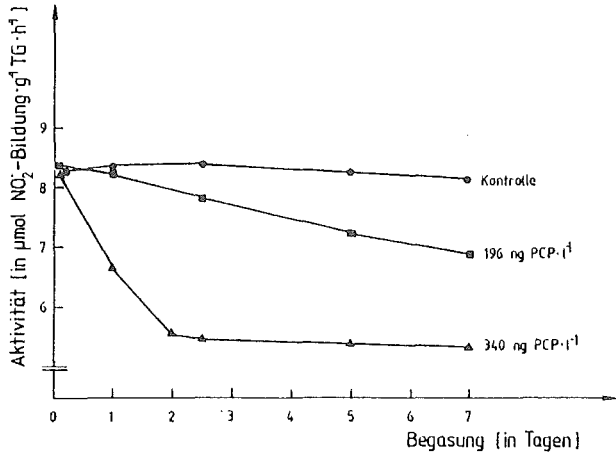


Abb. 6: Wirkung von gasförmigem PCP auf die "in vivo"-Aktivität der Nitratreduktase.

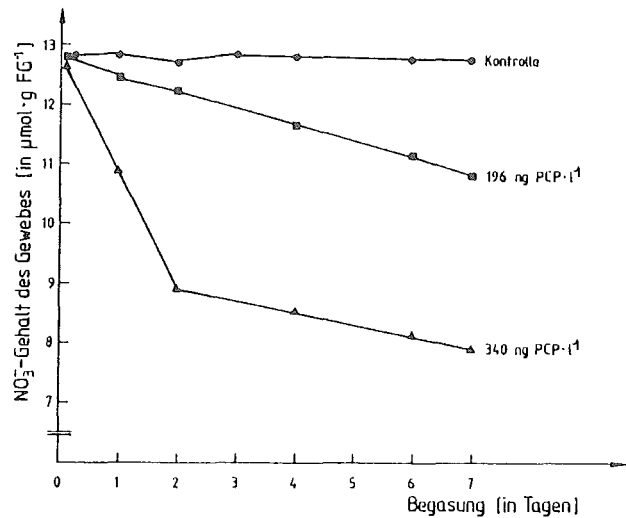


Abb. 7: Wirkung von PCP-Gas auf die Nitratkonzentration im Gewebe von *Lemna minor*.

dieses Enzyms wird mit einem "in vivo"-Test gemessen. Auf den ersten Blick wird die Aktivität dieses Enzyms durch PCP im Gasraum massiv beeinflusst (Abb. 6). Betrachtet man allerdings zu dem Enzym das im gesamten Gewebe vorhandene Nitrat - dem Substrat der Nitratreduktase - so findet man eine signifikante Konzentrationsabnahme (Abb. 7). Damit kann die geringe Aktivität der NAR während einer PCP-Behandlung eventuell mit einer Enzymreprimierung erklärt werden. Die Abnahme der Nitratmengen im Gewebe ist sicher auf die Entkopplereigenschaften des PCPs zurückzuführen (Weinbach et al., 1967). Durch die Entkopplung der oxidativen oder der Photophosphorylierung wird offensichtlich nicht mehr genügend ATP für die Nitrataufnahme zur Verfügung gestellt. Die Bedeutung von ATP für die Nitrataufnahme wurde bei der Blaualge *Anacystis nidulans* untersucht (Ohmori et al., 1977). Auch bei dieser Pflanze führten Entkoppler der oxidativen oder der Photophosphorylierung zu einer verringerten Nitratakkumulation.

Da *Lemna minor* die einzige Lemnaceae ist, bei der wir keine Nitritfreisetzung unter PCP-Einfluß feststellen konnten, bestätigt sich der Verdacht, daß die Nitrataufnahme gehemmt ist.

Damit dürfte ein direkter Einfluß von PCP auf die Nitratreduktase ausgeschlossen werden. Dies wurde in ähnlicher Weise auch bei den anderen untersuchten Enzymen festgestellt. Dort hatten die PCP-Konzentrationen im Gasraum gleichfalls keine signifikanten Effekte.

3.3. Äthylen-Wirkungen

3.3.1. Einfluß auf das Wachstum

Die stärksten Reaktionen auf Äthylenbegasung (1000 ppm) zeigten *Veronica beccabunga* und *Nasturtium officinale*. Die Vermehrungsrate von *Lemna minor* dagegen wurde praktisch nicht beeinflusst (Abb.8).

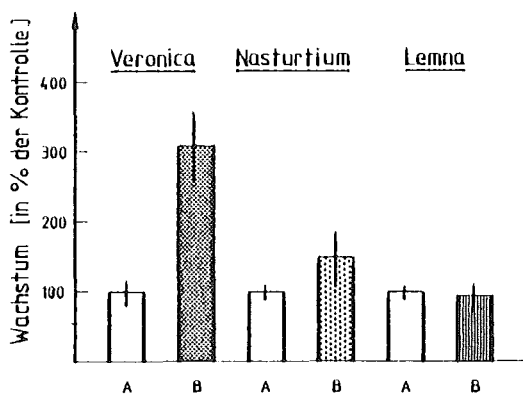


Abb.8: Einfluß einer kontinuierlichen Begasung mit 1000 ppm Äthylen auf das Wachstum von *Veronica beccabunga*, *Nasturtium officinale* und *Lemna minor*. Gemessen wurde die Internodienlänge bzw. die Vermehrungsrate (*Lemna*).

A = Kontrolle" B = begasete Probe.

Möglicherweise sind diese differenzierten Wirkungen des Äthylens darauf zurückzuführen, daß die untersuchten Pflanzen unterschiedlichen Ökotypen zugeordnet werden müssen. *Veronica beccabunga* und *Nasturtium* sind Amphiphyten, d.h. sie wachsen in Ufer- oder Sumpfbereichen und sind mit dem größten Teil des Vegetationskörpers über der Wasserlinie. *Lemna minor* dagegen ist ein Vertreter des Pleustons und schwimmt damit ständig auf der Wasseroberfläche. Bei Amphiphyten kann es vorkommen, daß die Pflanzen bei Hochwasser

völlig überschwemmt werden. Dies führt nachweislich zu einer starken Äthylenproduktion dieser Pflanzen (Musgrave & Walters, 1973), die bewirkt, daß diese Pflanzen möglichst schnell wieder aus dem Wasser herauswachsen. Damit ist eine empfindliche Reaktion auf Äthylen vorgegeben. Bei der pleustischen *Lemna minor* tritt dieser Fall natürlich nie ein und die Lemmen zeigen praktisch keine Reaktion gegenüber einer Äthylenbegasung.

3.3.2. Einfluß auf die Photosynthese

Die Photosyntheseleistung der drei Testpflanzen wurde gleichfalls sehr unterschiedlich beeinflusst (Abb.9).

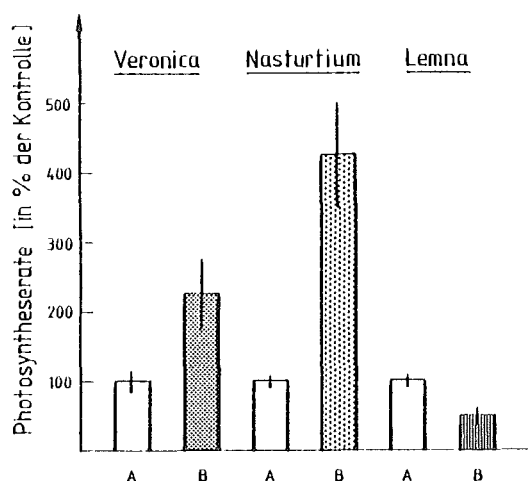


Abb.9: Wirkung von 1000 ppm Äthylen auf die Photosyntheseaktivität von Veronica, Nasturtium und Lemna. Die O_2 -Produktionen der Kontrollen waren bei Lemna $161 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl.} \cdot \text{h}^{-1}$, bei Veronica $170 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chlorophyll} \cdot \text{h}^{-1}$ und bei Nasturtium $153 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chlorophyll} \cdot \text{h}^{-1}$. A = Kontrolle; B = begaste Probe.

Die Photosyntheserate von Lemna war nach zweitägiger Begasung mit 1000 ppm Äthylen signifikant niedriger als die der Kontrolle. Veronica beccabunga und Nasturtium officinale dagegen zeigten eine erhöhte Photosyntheseaktivität. Auch dieses verschiedene Verhalten kann vielleicht mit der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Ökotyp erklärt werden (s.o.). Eine weitere Erklärung kann sein, daß bei Veronica und Nasturtium, die ja ihre Überwasserteile in den Gasraum hineinstrecken, die Äthylenaufnahme über die Oberfläche günstiger ist als bei einer Schwimmblattpflanze. Inwieweit eine direkte Einwirkung des Äthylen in die photosynthetischen Primärvorgänge in Frage kommt, wird zur Zeit noch geprüft.

3.4. Schlußfolgerungen

Bei physiologisch relevanten Temperaturen können nicht mehr als $340 \text{ ng PCP} \cdot \text{l}^{-1}$ in die Gasphase gebracht werden. Bei dieser Konzentration sind nur bei längerer Begasung eindeutige Wirkungen zu erwarten. Ein Biotest mit Lemnaceen auf gasförmiges PCP scheint daher nicht möglich, und zwar vor allem auch deshalb, weil die PCP-Effekte nicht spezifisch sind. Auch andere Schadstoffe führen zu den genannten Reaktionen der Pflanzen.

Ähnliche Aussagen treffen für das Äthylen zu. Auch hier zeigen nur Begasungen mit sehr hohen Konzentrationen, die in der Umwelt niemals vorkommen (ca. 0,1 ppm Fukada & Toyama, 1982), signifikante Veränderungen bei den untersuchten Wasserpflanzen.

Damit läßt sich zusammenfassend sagen, daß Wasserpflanzen als Testsysteme für gasförmige Schadstoffe nur wenig geeignet erscheinen. Genauere Details zu diesen Untersuchungen sind der Dissertation von V. Schubert "Reaktionen von Wasserpflanzen auf gasförmige Schadstoffe" (in Vorbereitung) zu entnehmen.

4. Bioakkumulation von PCP in der Nahrungskette

4.1. Material und Methoden

Bei den mit makrophytischen Wasserpflanzen und einigen Wassertieren durchgeführten Untersuchungen zur Ermittlung der Bioakkumulation wurde Pentachlorphenaol (PCP) als Testchemikalie verwendet. In den meisten Fällen wurde PCP dabei in Form des Na-Salzes appliziert, teilweise kam auch ^{14}C -marktiertes PCP zum Einsatz. Um die Aufnahme und Abgabe sowie die Verteilung und den Transport der Chemikalie genau verfolgen zu können, war eine Optimierung der gaschromatographischen Rückstandsanalytik nötig.

Bei Frischmaterial von *Elodea canadensis* erbrachte eine Methanol-extraktion, bei Frischmaterial von *Gammarus roeselii* eine mit

0,1 M K_2CO_3 -Lösung die besten Ausbeuten. Ansonsten lehnte sich die PCP-Nachweismethode an das von Gebefügi, Parlar und Korte (1979) beschriebene Verfahren an. Alle übrigen Methoden zu den unter Punkt 4 wiedergegebenen Versuchen werden bei A. Sigl (Diss. TU München, in Vorbereitung) beschrieben. Bei der Erläuterung der ausgewählten Versuche wird jeweils die eingesetzte PCP-Menge sowie die Einwirkzeit angegeben. Die für die Versuche benutzten Hartwasserpflanzen und Wassertiere entstammten dem Fließwassersystem Moosach (Münchener Schotterebene), die Weichwasserpflanzen den Flüssen Naab, Pfreimd und Schwarzach in der Oberpfalz.

4.2. PCP-Akkumulation bei Wasserpflanzen

Die Aufnahme von PCP durch makrophytische Wasserpflanzen unterscheidet sich bei verschiedenen pH-Werten deutlich. Abb. 10 gibt beispielhaft das pH-abhängige Akkumulationsverhalten von *Elodea canadensis* wieder.

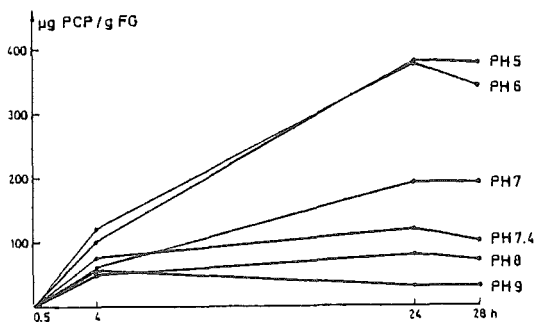


Abb. 10: Die PCP-Akkumulation von *Elodea canadensis* in Abhängigkeit vom pH und der Zeit. PCP-Gehalt des Wassers: 3 mg/l.

Bei pH 5 und 6 hatte *Elodea* nach 24 h ca. 380 µg PCP/g FG PCP aufgenommen, bei pH 9 sank die von der Pflanze in der gleichen Zeit aufgenommene Menge auf etwa 1/10 dieses Wertes ab. Auffällig war dabei, daß eine PCP-Sättigung der Pflanzen bei hohen pH-Werten viel früher erreicht wurde als bei niedrigen Werten. Die pH-Abhängigkeit der PCP-Akkumulation dürfte darauf zurückzuführen sein,

daß die undissoziierte Verbindung besser von den Pflanzen aufgenommen wird als die in ionischer Form.

Es gibt makrophytische Wasserpflanzen, die sowohl in Hartwasser- wie auch in Weichwasserbiotopen gedeihen. Die Formen aus den Gewässern mit niedrigem Kalkgehalt zeigten dabei stets höhere Akkumulationsraten als die aus kalkreichen Gewässern (Abb.11).

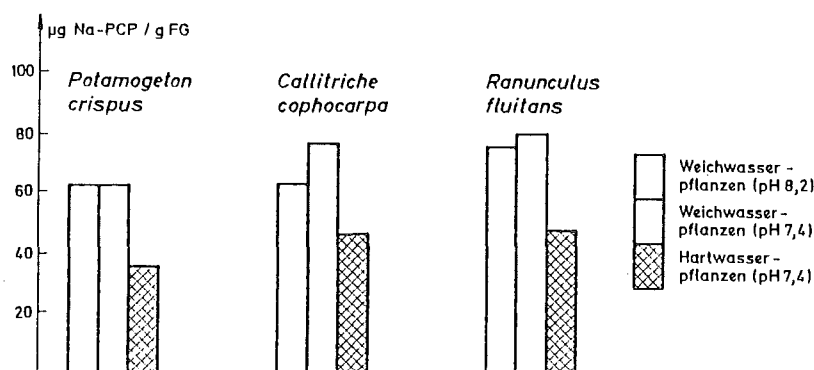


Abb. 11: PCP-Akkumulation der Hart- und Weichwasserform von drei Makrophyten. Inkubation: 24 h bei 0,5 ppm PCP; linker Balken: Weichwasserform in Weichwasser pH 8,2; mittlerer Balken: Weichwasserform in Hartwasser pH 7,4; rechter Balken: Hartwasserform in Hartwasser pH 7,4.

Der unterschiedliche pH-Wert dieser beiden Biotope spielt für diese Erscheinung keine Rolle, da die Weichwasserpflanzen (pH-Wert zum Zeitpunkt der Pflanzenentnahme 8,2) auch bei den pH-Werten des Hartwassers (pH 7,4) stets höhere PCP-Gehalte aufwiesen. Auch Unterschiede im pH-Wert der Pflanzen (im Homogenisat gemessen) konnten für die unterschiedliche Akkumulationsrate der Weich- bzw. Hartwasserformen nicht verantwortlich gemacht werden. Ursache dafür dürfte sein, daß die Formen aus dem Weichwasser wesentlich zarter sind und daher bei gleichem Gewicht eine wesentlich größere Oberfläche aufweisen als die aus dem Hartwasser.

Die pH-Abhängigkeit der PCP-Akkumulation bei Wasserpflanzen machte sich auch bei variierenden Belichtungsverhältnissen bemerkbar. Wurde *Elodea* 24 h im Dauerdunkel gehalten, so sank der pH-Wert des Mediums von 7,4 auf 7,2 ab und die PCP-Aufnahme war demzufolge wesentlich größer (750 µg PCP/g TG) als im Dauerlicht (200 µg PCP/g TG), wo sich ein pH von 8,8 einstellte. Ein Licht-/Dunkelwechsel von 12:12 h erbrachte einen Gehalt von 430 µg PCP/g TG (bei pH 7,55) und damit etwa einen Mittelwert zwischen den Beträgen für Dauerlicht bzw. Dauerdunkel.

Für insgesamt 33 verschiedene Wasserpflanzenarten aus Hart- und Weichwasserbiotopen wurde die Zeitabhängigkeit der PCP-Aufnahme, bei einem Gehalt des Wassers von 0,5 mg PCP/l und bei sechs von diesen Arten auch der saisonale Einfluß auf das Akkumulationsverhalten ermittelt. Diese Versuche wurden unter Stagnationsbedingungen durchgeführt. In keinem Fall ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen PCP-Gehalt der Pflanzen und der Inkubationsdauer, sondern diese Abhängigkeit erbrachte einen typischen Sättigungsverlauf. Aus den jeweiligen Kurven wurde die von den Pflanzen maximal aufgenommene PCP-Menge (= Sättigungskonzentration) sowie die Zeit ermittelt, bei der die Halbsättigung der Pflanzen mit PCP bei der vorgegebenen Konzentration des Wassers von 0,5 mg PCP/l erreicht war. Diese Werte sind für die Untersuchungsjahre 1981 und 1982 in Tab. 1 wiedergegeben. Besonders bei den untersuchten *Potamogeton*-Arten schwanken die Halbsättigungszeiten zwischen den beiden Jahren erheblich, bei den übrigen Arten wurde die Halbsättigung im Vergleich der Jahre nach sehr ähnlichen Zeiten erreicht.

Bezüglich der Sättigungskonzentration ergeben sich bei den meisten Arten erhebliche Abweichungen zwischen den Jahren. Durchschnittlich

Tab. 1: PCP-Halbsättigungszeiten und PCP-Sättigungskonzentrationen von Makrophyten aus Hart- und Weichwasserbiotopen im Vergleich der Jahre 1981 und 1982

	Halbsättigungszeit 1981 (h)	Sättigungskonz. 1981 (µg PCP/g FG)	Halbsättigungszeit 1982 (h)	Sättigungskonz. 1982 (µg PCP/g FG)
H <i>Leptodictyum riparium</i>	0,2	40	0,2	40
H <i>Fontinalis antipyretica</i>	0,4	36	0,4	36
W - " -	1,3	50	1,3	50
H <i>Lemna trisulca</i>	0,8	30	0,9	30
H <i>Sparganium emersum</i>	0,4	26	0,4	26
H <i>Zannichellia palustris</i>	0,4	50	0,3	20
W <i>Sagittaria sagittifolia</i>	4,0	100	4,0	100
H <i>Potamogeton densus</i>	2,0	64	0,5	32
H - " - <i>lucens</i>	3,9	106	1,8	50
H - " - <i>crispus</i>	6,4	132	18,5	38
W - " - - " -	1,75	174	1,9	62
H - " - <i>natans</i>	3,9	92	3,5	60
W - " - - " -	1,75	154	2,4	58
W - " - <i>nodosus</i> SB	1,75	248	8,0	120
W - " - - " - UW	2,25	144	3,0	78
H - " - <i>coloratus</i>	2,5	58	2,4	50
W - " - <i>berchtoldii</i>	2,9	66	1,8	60
H <i>Elodea canadensis</i>	3,0	90	3,0	60
W - " - - " -	3,5	150	3,0	34
H <i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	2,75	24	3,0	18
H <i>Ranunculus fluitans</i>	2,5	68	2,8	50
W - " - - " -	2,25	164	2,4	38
H - " - <i>circinatus</i>	2,75	66	4,5	100
W - " - <i>peltatus</i>	1,5	110	1,75	74
W - " - <i>penicillatus</i>	1,25	110	1,5	56
H <i>Nymphaea alba</i>	2,0	64	2,25	38
H <i>Mentha aquatica</i>	3,0	28	2,5	6
H <i>Veronica beccabunga</i>	0,5	68	1,0	18
W <i>Callitriche cophocarpa</i>	2,1	80	2,4	38
H - " - <i>obtusangula</i>	1,0	60	0,92	54
W - " - <i>hamulata</i>	0,4	6	0,5	
H <i>Hippurus vulgaris</i>	2,25	64	2,6	44
H <i>Sium erectum</i>	2,5	70	2,98	40
H <i>Nasturtium spicatum</i>	2,25	60	3,1	50
W <i>Myriophyllum spicatum</i>	1,6	110	1,8	80
W - " - <i>alterniflorum</i>	1,5	100	1,75	80
H - " - <i>verticillatum</i>	2,25	70	2,4	60
W <i>Ceratophyllum demersum</i>	1,7	80	0,5	50

SB = Schwimmblatt

H = Hartwasserpflanzen

UW = Unterwasserblatt

W = Weichwasserpflanzen

gesehen liegen die Sättigungskonzentrationen der Arten aus den Weichwasserbiotopen über denen der Arten aus Hartwässern. Sehr einheitlich verhielten sich die beiden untersuchten Wassermoose sowohl hinsichtlich der Absolutwerte als auch im Vergleich der zwischen den beiden Jahren ermittelten Werte. Ansonsten konnte kein einheitliches Akkumulationsmuster innerhalb der untersuchten systematischen Verwandtschaftskreise und ökologischen Gruppen festgestellt werden. Wie nicht anders zu erwarten, wurde die Halbsättigung bei zusätzlich im Durchflußsystem untersuchten Pflanzen wesentlich rascher erreicht als im Stagnationssystem. Die Sättigungskonzentrationen unterschieden sich dagegen kaum.

Während der Vegetationsperiode nahm die Halbsättigungszeit bei *Elodea canadensis*, *Veronica beccabunga* und *Ranunculus trichophyllus* deutlich zu (Abb.12), bei *Callitriche obtusangula*, *Nasturtium officinale* und *Sium erectum* war keine einheitliche Tendenz zu beobachten (alle Arten aus dem Hartwasserbiotop). Wie dieselbe Abbildung (12) zeigt, nahm die Sättigungskonzentration bei den vier Arten von März bis September dagegen ab.

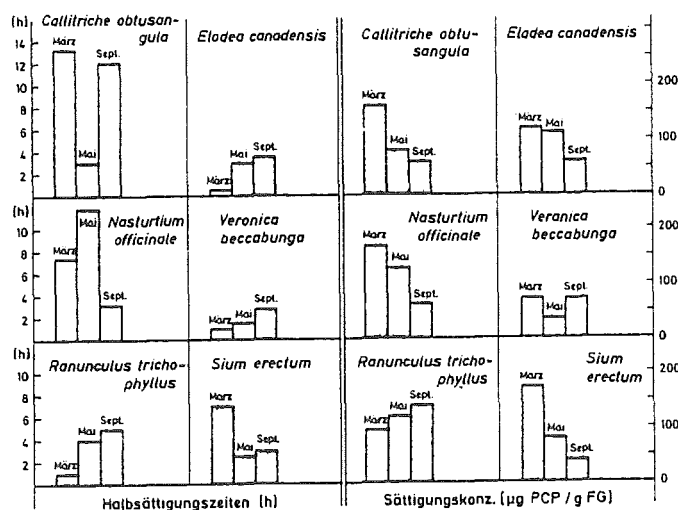


Abb. 12: Halbsättigungszeiten und Sättigungskonzentrationen von 6 Makrophyten zu verschiedenen Jahreszeiten. Inkubation bei 0,5 ppm PCP.

Untersucht wurde auch das Dekontaminationsverhalten verschiedener Arten (*Elodea canadensis*, *Fontinalis antipyretica*, *Mentha aquatica*). Setzt man PCP-haltige Pflanzen in PCP-freies Wasser um, so ergibt sich eine artspezifische Entsättigungskurve, die hyperbolischen Charakter hat. In einem Zeitraum von 4 bis 6 h wurde durchschnittlich die Hälfte des akkumulierten PCPs wieder abgegeben (Vorkontamination 24 h bis 0,5 ppm).

An ausgewählten Arten (*Mentha aquatica*, *Fontinalis antipyretica*, *Ranunculus fluitans*, *Callitriche obtusangula* und *Veronica beccabunga*) wurde untersucht, ob PCP an zelluläre Bestandteile gebunden ist oder in der wässrigen Phase dieser Arten vorkommt. Es stellte sich heraus, daß das aufgenommene PCP fast ausschließlich an zelluläre Bestandteile gebunden war und dabei zu 99 % in der Rohfettfraktion extrahiert werden konnte. Der Anteil des in kutikuläre Fette und Wachse gebundenen PCPs betrug dabei durchschnittlich 30 - 40 %. Da der Chlorophyll- und Fettgehalt dieser Arten während der Vegetationsperiode zunahm, verändert sich auch das Bild der PCP-Akkumulation, wenn man diese Parameter anstelle des Frisch- oder Trockengewichts als Bezugsgröße wählt.

Von besonderem Interesse war auch die Frage, ob innerhalb von Wasserpflanzen ein Transport von PCP stattfindet. Antwort darauf gaben Untersuchungen an amphibischen Wasserpflanzen (*Mentha aquatica*, *Veronica beccabunga*, *Sium erectum* und *Nasturtium officinale*), wobei der Xylemtransport durch Zugabe von Na-PCP bzw. ^{14}C -PCP zu den untergetauchten Pflanzenteilen und der Phloemtransport durch Auftragen ^{14}C -PCP-haltiger Vaseline auf die emersen Blätter festgestellt wurde. Nachzuweisen war sowohl ein basi- wie auch akropetaler Transport von PCP. Beim Xylemtransport akkumulierte sich dabei in den jungen emersen Sproßteilen mehr PCP als in den alten.

4.3. PCP-Akkumulation bei Wassertieren

Bei einigen Wassertieren, die als Konsumenten bzw. Besiedler makrophytischer Wasserpflanzen eine Rolle spielen (*Gammarus roeselii*, *Galba palustris*, *Galba trunculata*, *Pisidium spec.* und *Asellus aquaticus*) wurde die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der PCP-Akkumulation untersucht.

Tab. 2: Halbsättigungszeiten und Sättigungskonzentrationen von *Elodea canadensis* und verschiedenen Wassertieren (Inkubation bei 0,5 mg PCP/l, 24 h).

Art	Halbsättigungszeit (h)	Sättigungskonzentration (µg PCP/g FG)
<i>Elodea canadensis</i>	0,5	110
<i>Galba palustris</i>	23	106
<i>Galba trunculata</i>	24	52,5
<i>Asellus aquaticus</i>	0,5	32
<i>Gammarus roeselii</i>	24	160
<i>Pisidium spec.</i>	18	15

Gegenüber makrophytischen Wasserpflanzen wird eine Sättigungskonzentration bei diesen Tieren, außer bei *Asellus aquaticus*, wesentlich später erreicht. Bei der Wasserassel ist die Zeit, in der die Halbsättigung erreicht wird (0,5 h), mit der von *Elodea canadensis* vergleichbar, die in diesen Versuchen mit eingesetzt wurde. Die bei den Versuchsbedingungen maximal akkumulierte PCP-Menge liegt bei diesen Tieren etwa in dem Bereich, der auch für Wasserpflanzen ermittelt wurde. Vergleichbar ist auch der Effekt, daß bei Wasserpflanzen wie auch Wassertieren im Durchflußsystem eine raschere PCP-Aufnahme erfolgt als im Stagnationssystem. Bei *Gammarus roeselii* z.B. hatten im Durchfluß gehaltene Tiere nach 24 h einen um 30 % höheren Gehalt als ansonsten unter gleichen Bedingungen im Stagnationssystem gehaltene.

Saisonal gesehen ergaben sich große Unterschiede im Akkumulationsverhalten von *Gammarus roeselii*. Ähnlich wie bei Wasserpflanzen spielt dabei eine Rolle, welcher Parameter (FG, TG, Fett, Protein) als Bezugsgröße gewählt wird. Im Oktober gesammelte Tiere wiesen einen deutlich höheren Fettgehalt (110 mg Fett/g TG) als im April gesammelte Tiere auf (70 mg Fett/g TG) und bei einer PCP-Belastung (12 h, 1,0 mg PCP/l Wasser) gleichzeitig auch signifikant höhere PCP-Gehalte (durchschnittlich 1400 µg PCP/g TG gegenüber 600 µg PCP/g TG).

Während bei Wasserpflanzen nahezu 100 % des aufgenommenen PCPs in der Rohfettfraktion gefunden wurde, waren es bei *Gammarus roeselii* nur ca. 90 %. 90 % macht auch die Dekontaminierungsrate innerhalb von 24 h aus, wenn vorher kontaminierte Gammariden (24 h bei 0,5 mg PCP/l Wasser) in PCP-freies Wasser umgesetzt wurden. Wesentlich langsamer verlief die Dekontamination bei den untersuchten Mollusken. *Galba palustris* gab nach 24 h wieder 50 %, *Galba trunculata* sogar nur 20 % des vorher akkumulierten PCPs wieder ab. Bei *Asellus* lag der Betrag bei 80 %.

4.4. PCP-Aufnahme über das Futter

Bei Untersuchungen zur PCP-Aufnahme der Tiere über kontaminiertes Futter bestand ein Problem darin, diese Aufnahme von derjenigen zu trennen, die über das PCP erfolgte, das von den kontaminierten Pflanzen während des Experimentes an das Wasser abgegeben wurde. Am besten war dieser Fehler in Durchflußsystemen zu umgehen, da hier ein intensiver Wasseraustausch gewährleistet war. Unter diesen Bedingungen war PCP dann nicht mehr im Wasser nachweisbar (Nachweisgrenze: 10 ppb). Nach 6 h hatten die für diese Versuche benutzten Gammariden nur ca. 0,4 µg PCP/g FG akkumuliert, der Gehalt der Pflanzen betrug nach dieser Zeit noch 100 µg PCP/g FG.

Bei einer PCP-Belastung bis 1 mg/l Wasser kam es über einen Zeitraum von 24 h zu keiner signifikanten Änderung der Fressrate. Diese betrug für die Kontrolle 27,8 mg/g FG x d, was einer durchschnittlichen täglichen Nahrungsaufnahme von 36 % des Körpergewichts der Einzelindividuen entsprach.

4.5. Übersicht und Bedeutung der Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zur Bioakkumulation von PCP durch Wasserpflanzen und Wassertiere verschiedener Biotope hat sich herausgestellt, daß die Aufnahme des Schadstoffes aus dem Wasser eine starke pH-Abhängigkeit aufweist. Für Wassertiere konnten Könemann & Musch (1981) sowie Kishing & Kobayashi (1980) nachweisen, daß die höhere Akkumulation bei niedrigen pH-Werten darauf beruht, daß die Membranpermeabilität verändert wird. Außerdem wird die Aufnahme der bei niedrigem pH undissoziierten Verbindung erleichtert. Für Wasserpflanzen dürften ähnliche Effekte eine Rolle spielen.

Starke Schwankungen der PCP-Akkumulation bestanden bei Wasserpflanzen hinsichtlich des Entnahmezeitpunktes während der Vegetationsperiode, hinsichtlich der verschiedenen untersuchten Biotope sowie im Vergleich der Jahre. Es ist nur in beschränktem Umfang möglich, die 33 untersuchten makrophytischen Wasserpflanzenarten bezüglich ihres PCP-Akkumulationsverhaltens in deutlich voneinander abgrenzende Kategorien einzuteilen. Das gilt sowohl für systematische wie auch für ökologische Gesichtspunkte. Nicht nachzuweisen war z.B. die von Hunter et al. (zit. in Strufe. 1968) festgestellte höhere Empfindlichkeit von dicotylen Pflanzen gegenüber PCP im Vergleich zu monocotylen Pflanzen. Man kann jedoch festhalten, daß Weichwasserpflanzen sowie die Weichwasserformen von sowohl in sehr kalkhaltigem, wie auch sehr kalkarmen Wasser gedeihenden Arten eine

durchschnittlich höhere Akkumulation aufweisen. Besonders einheitlich war auch das Akkumulationsverhalten der beiden untersuchten Wassermoose. Ob das auch für andere submerse Moose gilt, müßten gezielte Untersuchungen zeigen. Die für die übrigen Arten beobachtete starke Abhängigkeit der PCP-Anreicherung von verschiedenen Einflußgrößen ist zwar von großem ökotoxikologischem Interesse, sie zeigt aber gleichzeitig, daß Freilandpflanzen, selbst bei einer ausreichenden Adaptation an die gegebenen Laborbedingungen, keine geeigneten Objekte für allgemein wiederholbare Standardtests sind. Diese Aussage trifft auch für die von uns untersuchten Wassertiere zu. Zwischen diesen bestehen ebenfalls signifikante Unterschiede in der Aufnahme und Abgabe von PCP, die für eine ökotoxikologische Bewertung von PCP in der Natur von Bedeutung sind. Da jedoch eine starke Abhängigkeit der PCP-Akkumulation z.B. von der Jahreszeit und der Tiergröße vorlag, müßten etwaige Standardtests an synchronisierten Populationen mit stets gleichem Alter und evtl. gleichen Geschlechts durchgeführt werden. Um dann noch eine Biomagnifikation innerhalb der Nahrungskette zu studieren, müßten die Tiere außerdem ein stets gleiches Freßverhalten zeigen. Das war in unseren Experimenten nicht der Fall.

5. Modellökosysteme

5.1. Material und Methoden

Als Modellteiche wurden Kunststoffbecken der Größe 400 x 100 x 90 cm (ca. 3 m³ Wasserkörper) im Freiland in den Boden eingegraben. Danach wurden die Becken mit einer 15 cm dicken Sedimentschicht aus gereinigtem Sand versehen, welcher mit einer definierten Menge an Bodenschlamm aus dem Flußsystem Moosach (Oberbayern) angereichert worden war. Mit diesem Sediment wurden Bakterien und Kleintiere

(Crustaceen, Rotatorien, Oligochaeten usw.) in die Systeme eingebracht. Anschließend wurden die Becken mit Wasser gefüllt und 8 Tage sich selbst überlassen. Dann wurden makrophytische Wasserpflanzen ins System eingepflanzt, und zwar zunächst *Ceratophyllum demersum*, *Myriophyllum verticillatum*, *Potamogeton crispus*, *Elodea canadensis*, *Potamogeton natans*, *Lemna trisulca* und *Chara hispida*. Diese Arten wurden gewählt, um submerse wie auch Schwimmblattpflanzen, bewurzelte und unbewurzelte, oligo- und eutraphente Arten im System zu haben. Von jeder Art wurden 7 Exemplare auf jedes Kompartiment verteilt. Da sich die eutraphente Art *Myriophyllum verticillatum* sehr schlecht entwickelte, wurde sie durch die oligotraphente Art *Potamogeton coloratus* ersetzt.

Zur Erfassung der Fauna und Mikroflora wurden über 11 Monate Proben aus den MES entnommen. Die qualitative und quantitative Erfassung des Phytoplanktons erfolgte alle 14 Tage, und zwar entweder direkt an Frischmaterial oder an mit Lugol'scher Lösung fixierten Proben. Die Proben für die Untersuchung der vorkommenden Zoozönosen wurden wöchentlich mit einem speziellen Schöpfgerät zufallsverteilt entnommen, und zwar vier Proben aus dem Wasserkörper und zwei Proben von der Beckenwand.

Phytoplankton und Zooplankton wurden mikroskopisch ausgewertet. Die aquatischen Makrophyten wurden zweimal im Jahr kartiert, um ihre Veränderungen im Verlaufe einer Vegetationsperiode festzustellen. Die abiotischen Faktoren wurden entweder direkt in den MES gemessen (Temperatur, Leitfähigkeit, O_2 -Konzentration, pH-Wert) oder es wurden Wasserproben entnommen, die im Labor auf gelöstes Phosphat, Gesamt-Phosphat, Nitrat, Nitrit, Ammonium, Silikat, Hydrogencarbonat, Chlorid, Natrium, Kalium, Calcium, Wasserhärte, organische Substanz,

Chlorophyll a und Phaeopigmente untersucht wurden. Die Kontrolle der abiotischen Faktoren erfolgte im Abstand von 14 Tagen. Dabei kamen die üblichen Methoden der Limnologie zur Anwendung.

5.2. Ergebnisse und Diskussion

5.2.1. Abiotische Faktoren

Die Untersuchung der wasserchemischen Daten läßt eine parallele Entwicklung der drei MES erkennen. Abb. 13 zeigt exemplarisch die Phosphat-, Nitrat- und Ammoniumgehalte im MES 1 von Mai 1982 bis März 1983. Phosphat- und vor allem Ammoniumverbindungen werden im

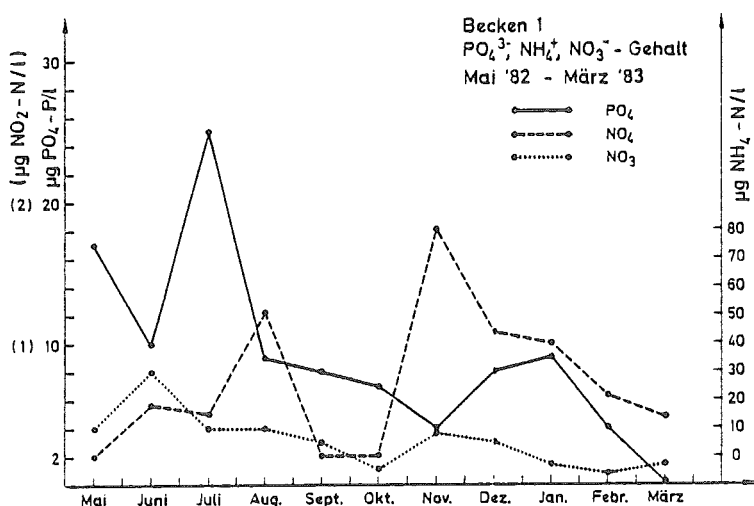


Abb. 13: Jahreszeitlicher Verlauf der Phosphat-, Nitrat- und Ammoniumgehalte in Becken 1.

Spätherbst und Frühjahr zu Minimumfaktoren. In der Vegetationsperiode ist eine Zunahme dieser Verbindungen meßbar. Die Nitratkonzentration dagegen bleibt das ganze Jahr etwa auf dem gleichen Niveau. Während des Winter 1982/83 konnten keine mineralisierenden Effekte festgestellt werden. Dies ist sicher auf die anhaltende Photosynthese- und Wachstums-Aktivität der Algen und Makrophyten im Laufe des milden Winters 1982/83 zurückzuführen. Diese Aktivität bewirkt einerseits einen ständigen O_2 -Überschuß (Sättigungswerte im Durchschnitt ca. 110 %), andererseits werden remineralisierte Nährstoffe sofort

wieder verbraucht. Aus der Vielzahl der weiteren Daten sei noch das Silikat herausgegriffen. Die Silikatwerte zeigen die typischen jahreszeitlichen Schwankungen: geringe Silikatmengen im Frühjahr und eine Zunahme des Silikatgehaltes im Sommer; anschließend wieder Abfall der Silikatkonzentration. Diese Veränderungen des Silikatgehaltes lassen sich klar mit dem Auftreten oder Verschwinden von Kieselalgen (z.B. *Fragilaria crotonensis*) korrelieren.

5.2.2. Phytoplankton

Die Zahl der Planktonarten hat von einer relativ großen Artenzahl zur Zeit der Planktonblüte von Mai bis Juni 1982 (Abb.14 und 15) in allen drei MES gleichmäßig auf zwei perennierende *Cryptomonas*-Arten, *Cryptomonas erosa* var. *reflexa* und *Cryptomonas marssonii*, abgenommen.

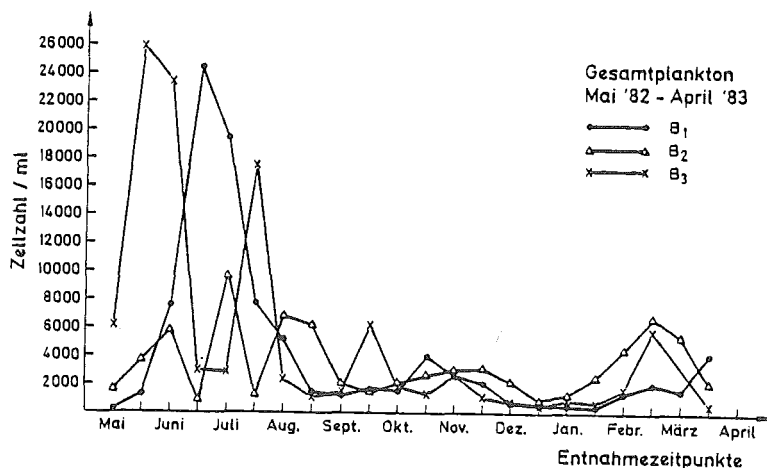


Abb. 14: Gesamtphytoplankton (Zellzahl/ml) in den drei Untersuchungsbecken B₁ - B₃.

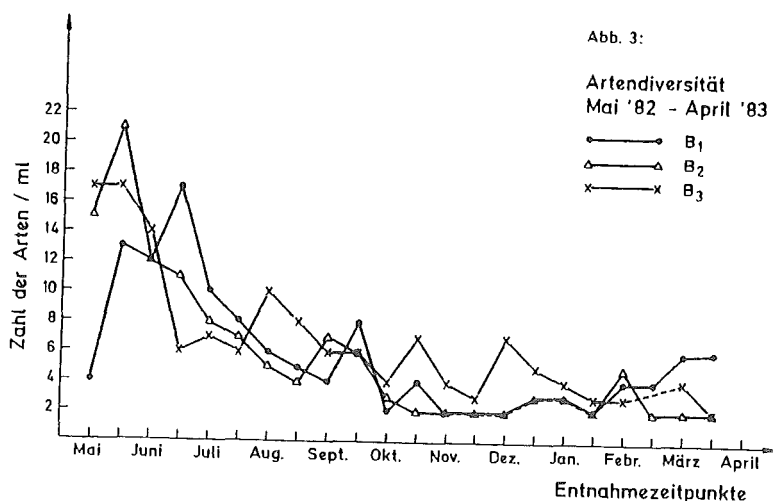


Abb. 15: Artendiversität des Phytoplanktons in den drei Untersuchungsbecken B₁ - B₃.

Vertreter der Cyanophyceae finden sich im System 1 und 2 vor allem im Frühjahr und im Sommer, während sie im Winter völlig fehlten. Im Becken 3 dagegen tauchten das ganze Jahr über Blaualgen auf, die vornehmlich zu den Gattungen *Anabaena*, *Dactylococcopsis*, *Merismopedia* und *Cyanarcus* gehören.

Vertreter der Desmidiaceen (überwiegend *Closterium* und *Cosmarium*-Arten) besiedelten von Mai bis September die Becken 1 und 2, während sie in Becken 3 nie auftraten. Sowohl bei den Blaualgen als auch bei den Zieralgen zeigt sich somit ein unterschiedliches Verhalten von Becken 3 gegenüber Becken 1 und 2. Dieser Unterschied geht mit Sicherheit auf den September 1981 zurück, wo das Becken 3 wegen eines Lecks noch einmal entleert werden mußte, was offensichtlich zum Absterben einiger Arten bzw. zur zusätzlichen Entwicklung anderer Arten geführt hat. Eine ähnliche Tendenz wird sich auch beim Zooplankton (s.u.) bemerkbar machen.

Insgesamt betrachtet ähnelt sich die Artenzusammensetzung des Phytoplanktons in den drei MES trotzdem sehr stark. Von den 38 vorkommenden Arten finden sich 32 in Becken 1 und jeweils 30 in Becken 2 und 3. Becken 1 und 2 unterscheiden sich in 9 Arten, Becken 2 und 3 in 10, und Becken 1 und 3 in 8 Arten. Dieses Ergebnis zeigt, daß bei sorgfältigem Einbringen des Bodensidements und der Makrophyten, mit denen die meisten Phytoplankter wohl in die Systeme eingebracht worden sein müssen, die Entwicklung der MES weitgehend parallel verläuft, so daß es durchaus möglich erscheint, gleichzeitig installierte Becken auch nach Schadstoffbelastung miteinander zu vergleichen.

5.2.3. Entwicklung der Makrophyten

Nach dem Einpflanzen im Herbst 1981 gingen die Makrophyten wegen des extrem kalten Winters 1981/82 zunächst stark zurück. Im Jahr

1982 dauerte es dann auch sehr lang, bis sie wieder austrieben. Im Verlauf des Sommers 1982 erholten sich die Makrophyten - mit Ausnahme der eutraphenten Art *Myriophyllum verticillatum* - wieder sehr gut. Alle drei MES wiesen im November 1982 und im April 1983 einen vergleichbar guten Bewuchs aus. Auch hier fällt das Becken 3 aus den schon vorher erwähnten Gründen etwas ab. Der gute Bewuchs im April 1983 ist darauf zurückzuführen, daß im Winter 1982/83 wegen der hohen Durchschnittstemperaturen fast keine Wachstumseinschränkungen stattfanden. Neben den klimatischen Einflüssen und der Nährstoffarmut spielt bei der weiteren Entwicklung der Makrophyten sicher auch die im Becken stattfindende biogene Entkalkung eine Rolle.

5.2.4 Fauna

Die Untersuchung der Fauna in den MES ergab folgende Ergebnisse. Die während der Vegetationsperiode 1982 in den drei MES beobachteten Arten verteilen sich, greift man die häufiger vorkommenden Arten heraus, auf die Gruppen der Rotatoria (13 Arten), Oligochaeta (1 Art), Crustaceae (2 Copepoden, 1 Ostracode, 8 Phyllopoden), Insecta (5 Insektenlarven, 1 Notonecta). Interessanterweise unterscheiden sich die Becken auch hier nur wenig in ihrer Artenzusammensetzung. Becken 1 unterscheidet sich von Becken 2 und 3 in einer Phyllopodenart; Becken 3 von Becken 1 und 2 in zwei Rotatorienarten und Becken 1 von Becken 2 in einer Rotatorienart. Nicht alle Arten sind jedoch ganzjährig vertreten. Dazu gehören zwei Phyllopodenarten, von denen eine im Frühjahr und die andere im Herbst auftritt, und vor allem einige Rotatorienarten. Einige von ihnen haben ein konkretes Sommermaximum. Dies gilt speziell für einige Arten, die als thermophil bekannt sind. Andere Arten traten nur zu Beginn der Untersuchungen auf. Es wird sich erst im weiteren Verlauf der Arbeiten zeigen, ob es sich um Winter- oder Frühljahrsverteter handelt,

oder ob sie in die Becken mit eingebracht wurden und sich dort aber nicht behaupten konnten.

Nicht nur in der Artenvielfalt, sondern auch in der zeitlichen Verteilung der Arten und ihrer Individuendichte zeigten die drei MES große Ähnlichkeiten. Die ersten Copepoden erschienen im Juli und entwickelten sich vor allem im Becken 1 und 2 ziemlich gleichförmig exponential (Abb.16). Zur Zeit der beiden Maxima Anfang September bestehen die beiden Populationen überwiegend aus Nauplien, die in dieser Phase die Hauptnahrung der Copepoden darstellen. Das Wachstum der Populationen wird durch Nahrungsmangel begrenzt. Im Becken 3 verläuft die Entwicklung der Copepoden langsamer und sie hat Ende Oktober noch keinen Maximalwert erreicht. Der Unterschied zu den Becken 1 und 2 liegt in der Zusammensetzung der Copepodengemeinschaft. Während in diesen Becken *Mesocyclops leuckarti* (Abb. 16) absolut dominant war, wird er in Becken 3 ab Ende September von *Eucyclops serrulatus* verdrängt. *E. serrulatus* kommt auch in den anderen beiden Becken vor, jedoch nur in geringer Zahl und mit grosser Vorliebe zu den Beckenwänden. Im Becken 3 dagegen bevorzugt er das freie Wasser.

Bei der Betrachtung der Entwicklung der Phyllopoden/Ostracoden ist zu berücksichtigen, daß diese Gemeinschaft wenige rein planktische Arten, die auch noch geringe Individuenzahlen besitzen, enthält, so daß ein Zusammenhang mit dem Phytoplankton nicht zwangsläufig gegeben ist. Weiterhin setzt sich das Phytoplankton der drei MES hauptsächlich aus Algen kleiner 15 μm zusammen (nicht dargestellt), so daß, falls direkte Nahrungskonkurrenz vorhanden ist, sie zu den durchweg dichteren Rotatorienpopulationen besteht. Trotzdem zeigt der Kurvenverlauf in allen Becken ein deutliches Frühjahrs- bzw. Frühsommer und ein Herbstmaximum (Abb.17). Anfang August hat die

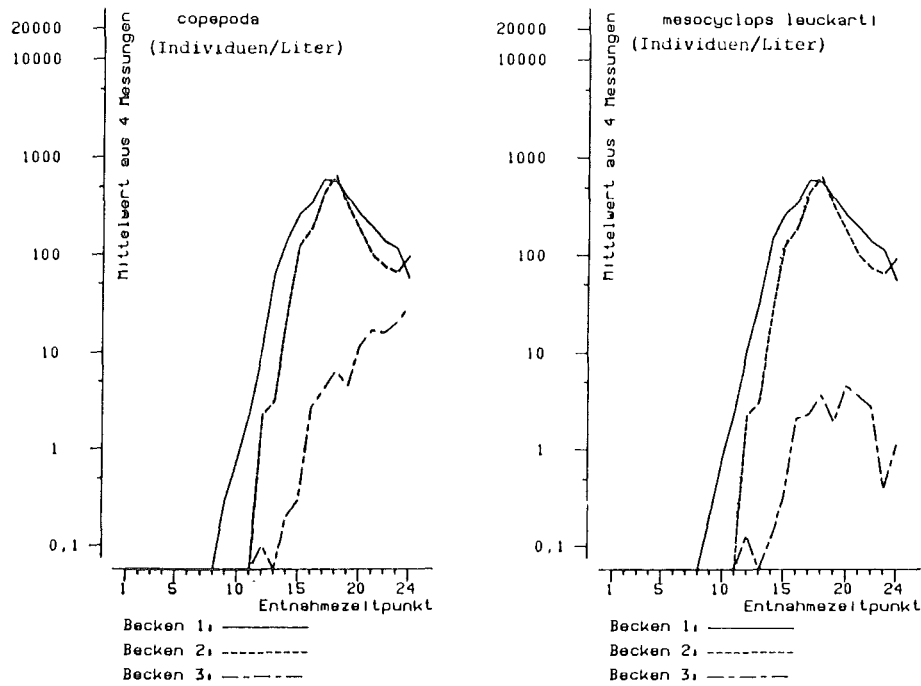


Abb. 16: Jahreszeitliche Entwicklung der Gesamt-Copepoden (linke Seite) und der Art *Mesocyclops leuckartii* (rechte Seite) in den drei Untersuchungsbecken (B_1 - B_3). Die Entnahmezeitpunkte sind wie folgt einzuordnen: Mai: 1-3; Juni: 4-7; Juli: 8-11; August 12-15; September: 16-20; Oktober: 21-24.

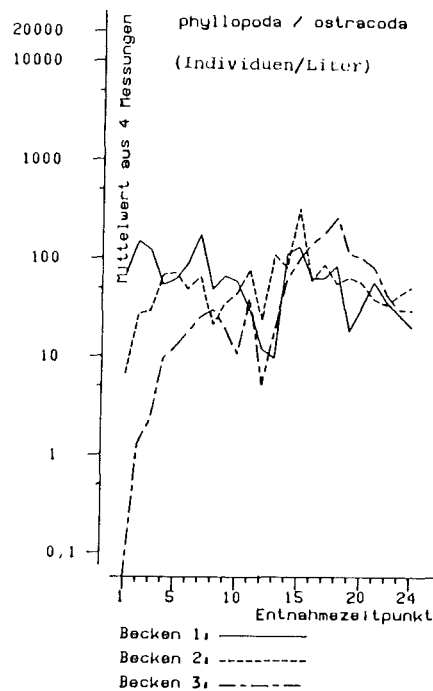


Abb. 17: Jahreszeitliche Entwicklung der Phyllopoden/Ostracoden in den drei Untersuchungsbecken (B_1 - B_3). Entnahmezeitpunkte wie in Abb.16.

Gemeinschaft ein Minimum. Daß das erste Maximum etwas spät im Jahr auftritt, mag mit dem langen und strengen Winter 1981/82 zusammenhängen.

5.3. Übersicht und Bedeutung der Ergebnisse

Betrachtet man die beschriebenen Ergebnisse im Hinblick auf die Zielsetzung der Arbeit (1. Entwicklung und Stabilisierung von MES und 2. Brauchbarkeit von MES zur Untersuchung von Schadchemikalien), so kann nach den bisherigen Befunden natürlich nur zum ersten Punkt eine Aussage gemacht werden. Punkt 2 wird erst im Folgeprojekt (Förderkennzeichen O3 7314 O) abschließend geklärt werden können.

Die Entwicklung und Stabilisierungsphase der MES läßt sich wie folgt zusammenfassen:

Die in der Einleitung präzisierten Voraussetzungen sind bei den aufgebauten MES weitgehend erfüllt. Es sind verschiedene Trophieebenen (Primärproduzenten, Primär- und Sekundärkonsumenten und wahrscheinlich auch Destruenten) in den Systemen vorhanden. Die Systeme sind in der Lage, über einen längeren Zeitraum zu existieren. Die Becken sind groß genug, daß die Probenentnahme nicht stört und daß eine ausreichende Artendiversität gegeben ist.

Die Populationsentwicklung in den drei Becken verläuft weitgehend parallel und es sind Beziehungen zwischen den verschiedenen Trophieebenen und auch zu den abiotischen Faktoren zu erkennen. Die Parallelentwicklung der drei Systeme ist überraschend gut, so daß - obwohl nicht vorgesehen - auch ein Vergleich zwischen den MES möglich erscheint. Einige der Ergebnisse belegen weiterhin, daß die drei MES am Ende der Vegetationsperiode 1982 ein gewisses Gleichgewicht erreicht hatten.

Insgesamt kann die Entwicklung und Stabilisierung unserer MES als gelungen angesehen werden. Sie führt zu einer nährstoff- und produktionsarmen Teichgesellschaft, die besonders empfindlich auf Schadstoffbelastung reagieren dürfte. Dadurch dürften sich die MES als Testsysteme für die Chemikalienprüfung als besonders geeignet erweisen.

Literatur

- Bauer, R., W. Huber u. N. Sankhla, 1975: Effect of abscisic acid on photosynthesis in *Lemna minor* L.. - Z. Pfl. Physiol. 77, 237-246
- Dortland, R.J., 1980: Toxicological evaluation of parathion and azinphos-methyl in freshwater model ecosystems. - Dissertation Wageningen
- Ferrari, T.E. u. J.E. Varner, 1971: Intact tissue assay for nitrite reductase in barley aleurone layers. - Plant Physiol. 47, 790-794
- Fukuda, K. u. S. Toyama, 1982: Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids. XI Ultrastructural changes of the chloroplasts in tomato leaves treated with ethylene and kinetin. - Cytologia 47, 725-736
- Gebefügi, J., H. Parlar u. F. Korte, 1979: Occurance of Pentachlorophenol in enclosed environments. - Oecotoxicology and Environmental Safety, 3, 269-300
- Huber, W., 1975: Die Bedeutung der Abscisinsäure für biochemische Anpassungen an Streßbedingungen. - Habil. Schrift, TU München
- Huber, W., V. Schubert u. Ch. Sautter, 1982: Effects of pentachlorophenol on the metabolism of the aquatic macrophyte *Lemna minor* L. - Environmental Pollution (Series A) 29, 215-223
- Jaworski, E.G., 1971: Nitrate reductase assay in intact plant tissues. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1274-1279

- Kishino, T. u. K. Kobayashi, 1980: A study on the absorption mechanism of PCP in Goldfish relating to its distribution between solvents and water. - Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 46, 1165-1168
- Klepper, L., 1974: Inhibition of the normal process of nitrite reduction. A mode of action of herbicides. - Res. Bull. Univ. Nebraska, No. 259
- Klepper, L., 1976: Nitrite accumulation within herbicide-treated leaves. - Weed Sci. 24, 533-535
- Könemann, H. u. A. Musch, 1981: Quantitative structure-activity relationship in fish toxicity studies. Part 2: The influence of pH on QSAR of chlorophenols. - Toxicology 19, 223-228
- Kohler, A., 1976: Makrophytische Wasserpflanzen als Bioindikatoren für Belastungen von Fließwasser-Ökosystemen. - Verh. Ges. Ökol., Wien 1975, 255-276
- Kuiper, J. 1981: The development of a microecosystem for predicting the influence of environmental stress caused by polluting chemicals. - TNO Report no. CL 81/3
- Lien, S. u. A. San Pietro, 1979: Effect of oxygen and pentachlorophenol on the induction lag of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. - Arch. Biochem. and Biophys. 197, 178-184
- Menzel, D.W. u. J. Case, 1977: Concept and design: controlled ecosystem pollution experiments. - Bull. mar. Sci. 27, 1-7

- Musgrave, A. u. J. Walters, 1973: Ethylene-stimulated growth and auxine-transport in *Ranunculus sceleratus* petioles. - New Phytol. 72, 783-789
- Ohmori, M., K. Ohmori u. H. Strotmann, 1977: Inhibition of nitrate uptake by Ammonia in a Blue green Alga, *Anabaena cylindrica*. - Arch. Microbiol. 114, 225-229
- Schuster, H., A. Kohler u. K. Kreeb, 1977: Eine neue Methode zur Beurteilung der Belastbarkeit von submersen Makrophyten. - Verh. Ges. Ökol., Göttingen 1976, 335-345
- Strufe, R., 1968: Problems and results of residue studies after application of molluscicides. - Residue Reviews 24, 103-115
- Weinbach, E.C., J. Garbus u. H.G. Sheffield, 1967: Morphology of mitochondria in the coupled, uncoupled and recoupled states. - Exp. Cell. Res. 46, 129-143.

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht 03 7228

Populationsdynamik von Rotatorien als Indikator für subletale
Schadstoffwirkungen

von

Manfred Siebert

Zoologisches Institut im Fachbereich Biologie
der J.W. Goethe - Universität Frankfurt/M.

Vorhabenleiter:

Prof. Dr. G. Siebert
Würzburg (ab Mai 1983)
in Nachfolge für
Prof. Dr. U. Halbach †
Frankfurt/M.

September 1984

Zusammenfassung

Anhand von Populations- und Einzeltierexperimenten wurden die Effekte subletaler Dosen von vier chemischen Substanzen auf die Populationsparameter Kapazität (K), potentielle Wachstumsrate (r), Oszillationsdauer (T), Pränanz (p), Lebensdauer und Fertilität ermittelt. Bei den Substanzen handelte es sich um Penta-chlorphenol (PCP), 4-Nitrophenol (4-NP), 4-Chloranilin (4-ClA) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Der angewandte Konzentrationsbereich lag zwischen 10 und 90 % der jeweiligen LC 50. 4-ClA wurde als Vergleichssubstanz in zwei Ringversuchen verwendet. Als Testorganismen dienten Rädertiere der Art *Brachionus rubens* EHRENBG. Die Tiere wurden aus geklonten Populationen in die Versuche eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, daß ein Teil der Populationsparameter als Meßgrößen in einer Toxizitätsermittlung verwendet werden können: Lebensdauer und Oszillationsdauer, insbesondere aber die Pränanz, erwiesen sich als wenig bzw. ungeeignet; dagegen waren Kapazität, potentielle Wachstumsrate und Fertilität gut geeignet. Die Untersuchungen wurden durch chemische Analysen der Substanzen begleitet. Es konnten keine Hinweise auf eine Degradation der Substanzen im Testmedium festgestellt werden. Adsorptionen an Glaswänden, Algen und Rädertieren erwiesen sich als vernachlässigbar gering. Metabolite wurden nachgewiesen; ihre Struktur wurde nicht aufgeklärt.

Summary

The population dynamics of the rotifer *Brachionus rubens* EHRENBG. were used, under controlled experimental conditions, as a bioassay for toxic substances in sublethal doses. Several population parameters were examined if they can be used as bioindicators in a toxicity test. These parameters are the carrying capacity (K), the intrinsic rate of natural increase (r), the wavelength (T) and the precision (p) of the oscillations, the lifespan and the fertility. The chemical substances, used for the experiments, were pentachlorophenol (PCP), 4-nitrophenol (4-NP), 4-chloroaniline (4-ClA) and (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid (2,4-D). The concentrations varied in an area between 10 and 90 % of the corresponding LC 50. 4-ClA had been used as test substance in a

ring-experiment program. Individuals of the rotifer species *Brachionus rubens* EHRENBG. were used as test organisms. The experiments show that the lifespan and the wavelength, and even more so the precision, were partly or totally unsuitable as bioindicators. On the other hand K , r , and the fertility turned out to be useful parameters. The fate of the four test substances was followed analytically. Metabolites from PCP, 4-NP, and 4-ClA could be found, but not identified definitely.

1. Einleitung

Bisherige toxikologische Untersuchungen, wie z.B. die Bestimmung der LC 50, haben sich als unzureichend erwiesen für eine umfassende ökotoxikologische Beurteilung chemischer Substanzen. In dem vorliegenden Bericht wird eine Testmethode vorgestellt, die es ermöglicht, auch subletale Effekte toxischer Chemikalien erkennbar zu machen. Dies geschieht mit Hilfe der Populationsdynamik des Rotators *Brachionus rubens* EHRENBG. (Abb. 1). Diese Art eignet sich wegen ihrer hohen Reproduktionsrate und ihrer kurzen Generationsfolge ausgezeichnet, um Chemikalieneffekte im Bereich sublethaler Konzentrationen sichtbar zu machen. Geringfügige Reduktionen der Vitalität, z.B. bei der Produktion der Nachkommen, welche an Einzeltieren kaum beobachtet werden können, werden durch die große Anzahl der Individuen einer Population auf dessen Niveau deutlich sichtbar. Einzelne Populationsparameter, wie die Kapazität (K), die potentielle Wachstumsrate (r), die Oszillationsdauer (T), die Lebensdauer und die Fertilität, dienen als Meßgrößen in diesem System.

Ziel der Untersuchungen war es, diese Populationsparameter auf eine Eignung als Meßgrößen für einen Ökotoxizitätstest zu überprüfen.

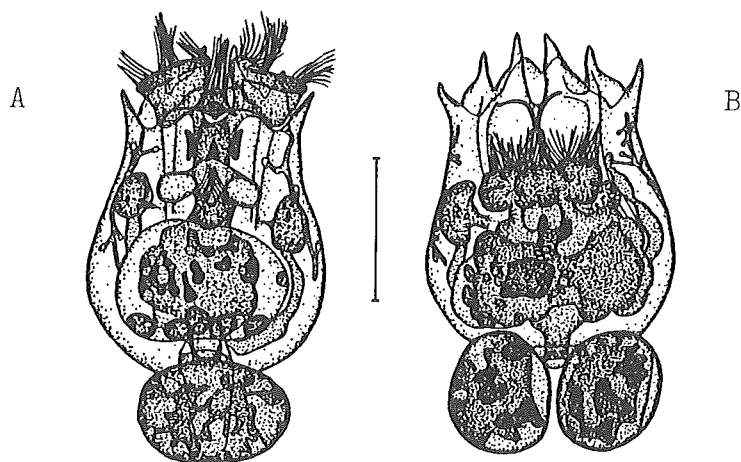


Abb. 1: Das Rädertier *Brachionus rubens* EHRENBG. mit angehefteten Subitaneiern. (A) ventrale, (B) dorsale Ansicht. Skalenläng gleich 100 μm .

2. Material und Methode

2.1. Die Rädertierkultur

Die Versuchsorganismen entstammten einer Freilandkultur aus einem Nidda-Altarm bei Frankfurt/M. Nach einer Adaptation an Laborverhältnisse wurde aus ihnen ein Klon für die Untersuchungen gezüchtet. Während der Anfangsphase von ca. 9 Monaten waren Stadien der sexuellen Fortpflanzung, Männchen und Dauereier, noch häufig in den Kulturen zu beobachten. Dies bedingte Schwierigkeiten bei dem Populationswachstum sowohl der Kulturen, als auch in den Versuchen, was sich in einer übermäßigen zeitlichen Ausdehnung der lag-Phase bzw. einer Stagnation der Populationsdichte auf niedrigem Niveau bemerkbar machte. Danach war parthenogenetisches Wachstum obligatorisch. Zudem nahm die Körpergröße der Tiere merklich ab; auch ein Anstieg der potentiellen Wachstumsrate, und damit der Dichte, war zu beobachten. Diese Phänomene wurden schon von BORAAS (1983) für eine kontinuierliche Durchflußkultur von *Brachionus calyciflorus* beschrieben. Die Rädertiere wurden in synthetischem Süßwasser, bestehend aus deionisiertem Wasser und verschiedenen anorganischen Salzen (Zusammensetzung siehe HALBACH und HALBACH-KEUP 1974) kultiviert. Sie befanden sich in 300 ml-Erlenmeyerkolben, die mit Parafilm abgedeckt waren. Die Temperatur des klimatisierten Kulturraums betrug 25 ± 1 °C. Die Beleuchtung wechselte in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 : 12 Stunden. Die Tiere wurden täglich gefüttert. Als Nahrung dienten einzellige Algen. Das Kulturmedium wurde zweimal wöchentlich erneuert.

2.2. Die Algenkultur

Die chlorococcalen Nahrungsalgen der Art *Monoraphidium minutum* (NÄGELI) KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ wurden, wie die Rädertiere, in synthetischem Medium kultiviert. Die anorganischen Komponenten des Mediums entsprechen der Darstellung bei HALBACH und HALBACH-KEUP (1974) mit folgenden Änderungen: 82,2 mg $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$; 75 mg $MgSO_4 \times 7 H_2O$; 25 mg $CaCl_2 \times 2 H_2O$; 0,06 mg $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ und 0,06 mg $Al_2(SO_4)_3 \times 18 H_2O$. Anstelle von 3,8 mg Fe(II)-EDTA wurden auf 6 l Medium je eine Spatelspitze Eisen(III)-citrat und EDTA gegeben. Das Medium wurde, inclusive der Spurenelemente, in einem 6 l-Rundkolben angesetzt und eine Stunde bei 120 °C und

1 Atmosphäre Überdruck autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Kulturgefäße mit der Luftzufuhr verbunden. Dabei wurde die Luft zunächst durch einen Chlorcalciumzylinder, gefüllt mit Watte und Kalksteinen, geleitet, um sie von Ölsuren und Staub zu befreien und zu trocknen. Anschließend wurde sie mit einem Bakterienfilter (Porengröße $0,2 \mu\text{m}$; $\varnothing = 55 \text{ mm}$) entkeimt, bevor sie in den Algenkolben eintrat. Die Belüftung verhinderte eine Sedimentation der Algen und bewirkte eine gute Durchmischung. Der Luftaustritt war mit einer Waschflasche mit KMnO_4 -Lösung gegen Bakterienkontamination abgesichert. Beleuchtet wurde mit 2 Leuchtstoffröhren von 1,2 m Länge und einer Leistung von 40 Watt in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 : 12 Stunden. Frische Kulturgefäße wurden entweder mit Algen von Schrägagarröhrchen inokuliert oder aus älteren Kulturgefäßen über sterile Glasrohre. Die Algen wurden bezogen durch die Sammlung von Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen, Stamm-Nr. 243-1 (SCHLÖSSER 1982).

Nach der Entnahme der Futteralgen wurden diese zentrifugiert, um die Schwermetallionen der Spurenelementlösung zu entfernen, da diese für Rädertiere toxische Eigenschaften besitzen. Die Algen wurden in Rädertiermedium resuspendiert. Für die Verfütterung in den Versuchen wurde die Dichte der Algensuspension über Extinktionsmessungen mit einem Photometer bei 680 nm und Vergleich mit einer Eichkurve ermittelt. Die Eichkurve wurde mit einem Hämatocytometer bzw mit einem Partikelzählgerät (Fa. Coulter) erstellt. Die Algen wurden während ihrer exponentiellen Wachstumsphase, also bei Dichten zwischen 5 und 20×10^6 Zellen pro Milliliter, verwendet.

2.3. Vorversuche

Die in den Kapiteln 2.4. und 2.5. beschriebenen Experimente sollten mit ausgesuchten Chemikalien durchgeführt werden. Um den subletalen Applikationsbereich festzulegen, waren Vorversuche in Form von LC 50-Bestimmungen notwendig. Diese Vorversuche wurden wie folgt ausgeführt: 50 juvenile Tiere mit einem Alter von etwa 2 Stunden und weniger (siehe Kap. 2.5.) pro Versuchsgefäß; 4 verschiedene Chemikalienkonzentrationen plus Kontrolle in je 5 Parallelen; 10^6 Algenzellen pro ml Medium; 7 ml Versuchsvolumen pro Gefäß und eine Versuchstemperatur von 25°C ;

Dauer der Versuche 24 h; die Versuchsgefäße wurden durch eine Drehapparatur (siehe Kap. 2.4.) gedreht.

Setzte man die Versuche ohne Nahrungsalgen an, kam es bei den juvenilen Tieren zu Hungereffekten, die die Ergebnisse verfälschten. BRAUER (Diss. 1983) konnte zeigen, daß trotz Klonen der Kulturen die Filtrierraten gleichaltriger Tiere konstant unterschiedlich sein können und, daß die ersten bis etwa 10ten Nachkommen eines Muttertieres etwa gleichwertige physiologische Leistungen zeigen, diese aber ab dem 10ten Nachkommen geringer werden.

Substanz	niedrigster Wert	höchster Wert	Ø
PCP	0,22	0,45	0,29
4-NP	6,6	13,0	9,1
4-ClA	109,4	109,4	109,4
2,4-D	85,0	90,0	87,6

Tab. 1: Ergebnisse der LC 50-Versuche.

Zahlenangaben in mg/l.

Daß zum Teil erhebliche Schwankungen der LC 50-Werte auftreten würden, konnte man schon an den, in einzelnen Fällen, starken Unterschieden der Versuchsp parallelen sehen. Einer der Gründe hierfür dürfte in der Ungleichheit der juvenilen Tiere bezüglich ihrer physiologischen Leistungen sein.

Der subletale Applikationsbereich wurde bei etwa 10-90% der jeweiligen LC 50 angesiedelt, da bei unseren Versuchen sowohl niedrige als auch relativ hohe Chemikalienkonzentrationen angewandt werden sollten.

2.4. Die Populationsversuche

Für dieses Experiment wurden bei Versuchsbeginn pro Gefäß 750 Tiere aus einem gut wachsenden Kulturgefäß ungezielt mit einer Glaspipette entnommen und als Startpopulation eingesetzt. Diese hohe Startzahl wurde gewählt, um eine lag-Phase zu umgehen und sehr schnell den Bereich der Oszillationen zu erreichen, was die Dauer der Experimente verkürzte. Als Versuchsgefäße dienten Schnappdeckelgläser mit einem Volumen von 15 ml. Die Populations-

dichte wurde täglich durch Entnahme von je drei Stichproben à 1 ml ermittelt. Gezählt und registriert wurden, je Stichprobe, die Gesamttierzahl und die Anzahl der Tiere mit 1,2,3 etc. Eiern, also damit auch die Anzahl der Eier in der Population. Ebenfalls täglich wurde das Medium, die Algen und die Chemikalie erneuert. Das Experiment wurde in drei Parallelen pro Konzentration und Kontrolle angesetzt. Als Versuchstemperatur wurde 25 °C gewählt, da hier nach bisherigen Erfahrungen (HALBACH 1970, 1973 und 1979) die Oszillationszeiten kürzer sind als bei niederen Temperaturen. Die Dauer der Experimente wurde auf maximal 30 Tage festgelegt. Da sich Oszillationen bei limitiertem Populationswachstum zeigen, wurde bei diesem Experiment das Volumen (15 ml) und die Nahrungsmenge (10^6 Algenzellen/ ml) fest vorgegeben. Bei dieser Algendosis stellt sich optimales Populationswachstum ein (HALBACH und HALBACH-KEUP 1974, PILARSKA 1977) d.h., die resultierenden Dichtewerte sind Maximalwerte.

Die Versuchsgefäße wurden auf einer Drehapparat (siehe HALBACH et al. 1983) befestigt und mit einer Geschwindigkeit von 1 Umdrehung in 4 Minuten gedreht. Zweck dieser Anordnung war es, die Sedimentation der Algen zu verhindern und sie so stets den Tieren als Nahrung verfügbar zu halten.

Für die chemischen Analysen wurden, dreimal im Laufe eines Experiments, Proben von jeweils drei aufeinander folgenden Tagen genommen, und zwar am 1., 2. und 3. Tag, am 14., 15. und 16. Tag sowie am 28., 29. und 30. Tag. Von jeder Konzentration standen somit pro Probe zwischen 30 und maximal 45 ml der chemischen Analyse zu Verfügung.

2.4.1. Auswertung der Versuche

Es wurden bei diesem Experiment die Parameter Kapazität (K), potentielle Wachstumsrate (r), Dauer (T) und Präganz (p) der Oszillationen bestimmt, und zwar wie in Abb. 2 und Abb. 3 dargestellt

K: Eine Mittelung über die 3 Parallelen jeder Konzentration ergab eine Mittelwertkurve (Abb. 15-17) aus deren Werten die Kapazität, als arithmetisches Mittel über den Zeitraum 1. bis 30. Tag, errechnet wurde.

r: Die Wachstumsraten wurden bestimmt durch die Gleichung $r = 1/t \times \ln N_t / N_0$, wobei N_0 stets 750 Tieren entsprach. "r" hat

nur während der Phase des exponentiellen Wachstums einer Population eine sinnvolle Bedeutung. Diese Phase ist in unseren Experimenten sehr kurz, weil wir schon mit einer hohen Startpopulation beginnen. Daher wurde als N_t die Dichte des 2. Tages, in manchen Fällen des 1. Tages festgelegt.

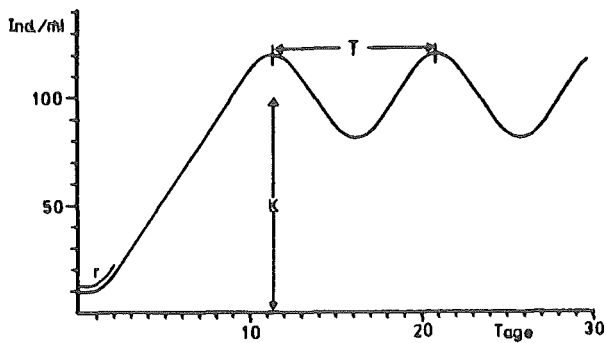
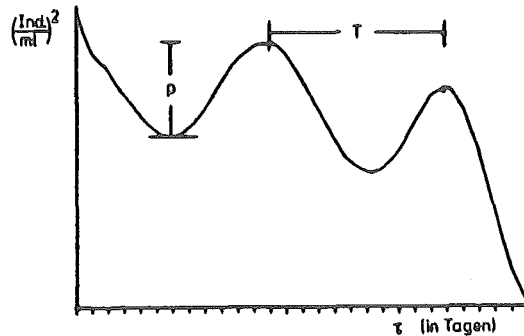


Abb. 2:

Abb. 3:

Schematische Darstellung der Populationsparameter Kapazität (K), potentielle Wachstumsrate (r), Oszillationsdauer (T) und Prägnanz der Oszillationen (p).



- T : Als Dauer der Oszillationen gilt die Zeit zwischen zwei aufeinander folgenden Oszillationsmaxima. Da die Oszillationen nicht immer deutlich zu Tage traten, wurden die Populationskurven einer Autokorrelationsanalyse unterzogen (WISSEL et al. 1980) Zweck dieser Analyse war es, die Oszillationen deutlicher erscheinen zu lassen, um so eine Bestimmung der Parameter " T " und " p " zu ermöglichen. " T " wurde demnach definiert als zeitlicher Abstand zweier Autokorrelationsmaxima (Abb. 3).
- p : Die Prägnanz wurde definiert als die Differenz zwischen dem ersten Minimum und dem darauf folgenden Maximum der Autokorrelationskurve. " p " trug die Dimension (Individuen/Volumen)². Dieser Parameter erwies sich jedoch als unbrauchbar, da bei der gleichen Substanz und gleicher Konzentration stets unterschiedliche Ergebnisse auftraten.

Sämtliche Rohdaten (Dichtewerte jeder einzelnen Parallele) wurden auf Magnetspeicher (Disketten) konserviert. Mit dem dazugehörigen

Rechner (Apple II) wurden die Mittelwertkurven berechnet und ausgedruckt, K und r berechnet, die Autokorrelationsanalysen durchgeführt, sowie auch die, für die statistische Überprüfung der K-Werte, benötigten t-Werte berechnet. Das hierzu notwendige Programm stammt von M. Westermayer.

2.5. Bestimmung von Lebensdauer und Fertilität

Diese Experimente wurden in sogenannten Präparategläsern (Vol. 2,5 ml) mit Schraubverschluß durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden ca. 500-1000 amiktische Weibchen mit Eiern aus den Kulturgefäßen isoliert. Nach ca. 2 Stunden waren genügend juvenile Tiere geschlüpft, die einzeln in die Versuchsgläser eingesetzt wurden. Pro Versuchslauf wurden 50 bzw. 100 juvenile Tiere benötigt. Die Versuchsparameter waren gleich denen der Populationsversuche. Die Versuche wurden zweimal täglich kontrolliert, da juvenile Tiere nach 12-14 Stunden nicht mehr von ihren Eltern-tieren zu unterscheiden sind. Dabei wurden vorhandene Nachkommen entnommen und gezählt. Das Medium, die Algen und die Chemikalie wurden täglich einmal erneuert. Die Versuchsgefäße befanden sich auch während dieser Experimente auf der Drehapparat. Die Versuche waren beendet, wenn alle Tiere abgestorben waren. Die Versuche wurden graphisch ausgewertet. Die Bestimmung der Fertilität erfolgte durch Integration der Flächen unter den Kurven automatisch mit einem Morphomat 10 der Fa. Zeiss.

2.6. Die Referenzchemikalien

Aus der Liste der Referenzchemikalien von dem PTU wurden die folgenden Substanzen für die Experimente wegen ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften ausgesucht, aber auch wegen ihrer bekanntermaßen erheblichen Toxizität. Geringe Volatilität und relativ gute Wasserlöslichkeit besaßen Priorität:

Phenol: Diese Substanz empfahl sich durch gute Wasserlöslichkeit. Außerdem existierten umfangreiche toxikologische Erfahrungen (BUIKEMA et al. 1979) mit Phenol und seinen Derivaten. Nach einer anfänglich erfolgreichen Anwendung der Substanz in den Experimenten (HALBACH et al. 1983, HALBACH 1984), dies aber noch bei 20 °C als Versuchstemperatur, waren nachfolgende Einsätze in Versuchen so extrem verschieden, daß toxikologische

Aussagen über Phenol mit den vorliegenden Ergebnissen nicht getroffen werden konnten. Vermutlich hängen diese irregulären Verhältnisse mit einem vorzeitigen Abbau der Substanz im Testsystem zusammen.

Pentachlorphenol (PCP): PCP wurde, wie auch 4-Chloranilin und 2,4-D, durch lang anhaltendes Rühren bei leichter Erwärmung (ca. 50-70 °C) in Lösung gebracht. Es wurden relativ hochkonzentrierte Stammlösungen hergestellt (ca. 10-12 mg/l), um einer bakteriellen Degradation vorzubeugen. Die Chemikalien wurden alle in Rädertiermedium gelöst. Dieses besitzt einen pH-Wert von 6,7.

PCP wurde, nach Anreicherung durch Wasserdampfdestillation oder durch einen stark basischen Anionenaustauscher und nach extraktiver Veresterung mit Essigsäureanhydrid, mit dem GC-ECD bestimmt.

4-Nitrophenol (4-NP): Stammlösungen von 4-NP wurden an jedem 4. Tag neu hergestellt und zwar in einer Konzentration von etwa 1 g/l.

Die Substanz wurde, nach extraktiver Veresterung mit Essigsäureanhydrid, als Nitrophenylacetat im GC-FID bestimmt.

4-Chloranilin (4-CLA): Die Stammlösungen von 4-CLA wurden in einer Konzentration von etwa 500 mg/l hergestellt.

4-CLA wurde durch Schüttelextraktion, bei sehr verdünnten Lösungen durch kontinuierliche flüssig-flüssig Extraktion, angereichert. Die Substanz wurde nicht derivatisiert und konnte direkt im GC-FID bestimmt werden. Für den Versuch "Tiberias" wurden die Proben spektrophotometrisch, nach einer Methode von M.A. EL-DIB (1971), bestimmt.

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D): Die Stammlösungen enthielten etwa 300 mg/l an Substanz.

Die Proben wurden durch Schüttelextraktion mit Dichlormethan und extraktiver Veresterung mit Bortrifluorid-Methanol aufbereitet. Nach anschließender Extraktion mit n-Hexan wurde die Substanz als 2,4-D-Methylester im GC-FID bestimmt.

Die Chemikalien wurden meistens in vier verschiedenen Konzentrationen plus Kontrollen eingesetzt (siehe Tab. 2). Damit sollte sowohl der eigentliche subletale Wirkungsbereich, als auch ein an den akuten Wirkungsbereich angrenzendes Konzentrationsniveau abgedeckt werden.

Tab. 2: Umrechnung der eingesetzten Konzentrationen von mg/l in $\mu\text{mol/l}$.

PCP: 0,05 mg/l - 0,19 $\mu\text{mol/l}$	4-NP: 1 mg/l - 7,2 $\mu\text{mol/l}$
0,10 " - 0,38 "	2 " - 14,4 "
0,15 " - 0,56 "	4 " - 28,8 "
0,20 " - 0,75 "	5 " - 36,0 "
0,25 " - 0,94 "	6 " - 43,2 "
	8 " - 57,6 "
4-ClA: 10 mg/l - 78,0 $\mu\text{mol/l}$	2,4-D: 20 mg/l - 86,7 $\mu\text{mol/l}$
20 " - 156,0 "	40 " - 173,3 "
40 " - 312,0 "	80 " - 346,7 "
80 " - 624,0 "	90 " - 390,0 "

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Eigene Versuche

Durch die Experimente ergaben sich eine Anzahl Populationskurven, von denen an dieser Stelle nur eine exemplarisch dargestellt werden soll (Abb. 15). Diese Kurven zeigen meist recht unregelmäßige Fluktuationen, welche kaum periodische Oszillationen erkennen lassen. Selbst bei den Kontrollen sind nur in Ausnahmefällen anscheinend regelmäßige Oszillationen zu sehen. Diese Erscheinungsform der Populationskurven machte es unmöglich, Populationsparameter, wie die Oszillationsdauer (T), anhand der gemessenen Werte zu bestimmen. Eine Autokorrelationsanalyse (siehe WISSEL et al. 1980) war unumgänglich. Außerdem konnte festgestellt werden, daß Wiederholungsversuche nicht immer einen ähnlichen Verlauf nahmen wie vorhergehende Versuche. Mögliche Ursachen konnten nicht eindeutig ermittelt werden. Erklärbar wären diese Verhältnisse durch die Vermutung, daß sich Populationen dieser Größe (ca. 50.000 Tiere pro Kulturgefäß) bei einer so kurzen Generationsdauer von ca. 8-10 Tagen und einer hohen Reproduktionsrate, auch als Klon, noch genetisch verändern. Dem würden auch die Beobachtungen entsprechen, daß sich die maximalen Dichten, die Wachstumsraten und die Größe der Tiere im Laufe der Kultivierungszeit des Klons veränderten.

Bei allen untersuchten Populationsparametern wurden die prozentualen Relationen ihrer Durchschnittswerte zu den jeweiligen

Kontrollen ermittelt und dargestellt (Abb. 4-7 und 12-14). Ferner wurden, nach HALBACH et al. (1983), die Dichtewerte der Populationen einer linearen Regression unterzogen, um so deren zeitliche Entwicklung erkennbar zu machen (Abb. 8-11 und 18-19). Im Bereich niedriger Konzentrationen sind kaum Auswirkungen auf Populationen und Einzelindividuen zu erkennen. Bei den Versuchen mit 4-Chloranilin und 2,4-D bewirkten niedrige Konzentrationen eine mehr oder weniger starke Erhöhung der Populationsdichten, und somit auch der Kapazitäten, gegenüber den Kontrollen (Abb. 15 und 6,7). Dies ließ sich bei beiden Chemikalien auf eine erhöhte Produktion von Eiern bzw. Nachkommen zurückführen (Abb. 13), bei 4-ClA jedoch nicht in den Einzeltierversuchen, sondern durch die Bestimmung der Eiraten während der Populationsversuche (Abb. 14). Hohe Konzentrationen von 2,4-D verminderten kaum die Eiraten, manche Tiere trugen zeitweilig bis zu zehn Eier an ihrem Körper, ließen aber kein Populationswachstum mehr zu, denn offensichtlich waren die Embryonen in den Eiern letal geschädigt (Abb. 13,14). Im Vergleich mit anderen Testorganismen vertrug *Brachionus rubens* relativ hohe Konzentrationen von 4-ClA. STÖRKEL (1984) verwendete bei seinen Versuchen mit *Daphnia magna* Konzentrationen, die um den Faktor 100 niedriger lagen. Angesichts dieser Tatsache kann man nicht mit einer hohen Sensibilität der Testorganismen gegenüber allen chemischen Substanzen rechnen.

PCP ist, wie die niedrigen Konzentrationen (Tab. 2) zeigen, bezüglich seiner Toxizität am höchsten einzustufen. Sämtliche Parameter werden, selbst durch sehr niedrige Konzentrationen, noch erheblich beeinflusst. Nur bei 0,05 mg/l zeigen die Rädertierpopulationen nahezu keine Schädigungen (Abb. 4, 12 und 13), was darauf schließen läßt, daß mit dieser Konzentration der Bereich des "no effect-levels" berührt wird.

Bezüglich Lebensdauer (Abb. 12) und Fertilität (Abb. 13) zeigten die Testorganismen auch bei relativ hohen Konzentrationen von 4-Nitrophenol keine Reaktionen. Der Verlauf der Populationskurven aller Versuche scheint eine Akkumulation der Substanz vermuten zu lassen (Abb. 9). HALBACH et al. (1983) interpretierten steigende Geraden als Hinweis für eine Adaptation an die entsprechende Chemikalie, während Geraden mit negativer Steigung als Akkumulation ausgelegt wurden. Nach dieser Interpretation ist 4-NP die einzige der vier Substanzen, an die sich die Rädertiere,

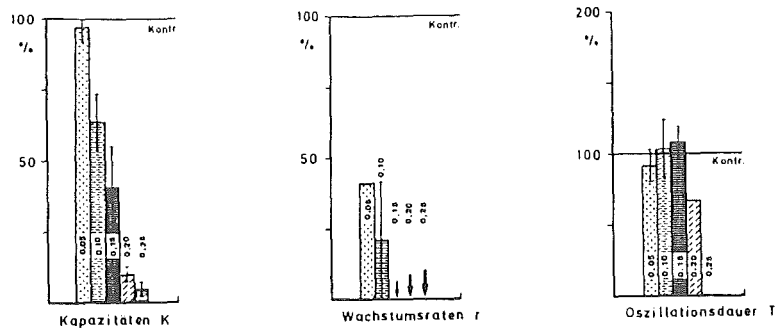


Abb. 4: Pentachlorphenol

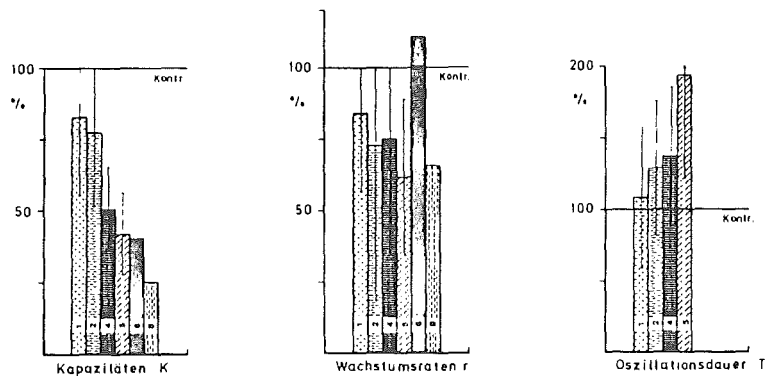


Abb. 5: 4 - Nitrophenol

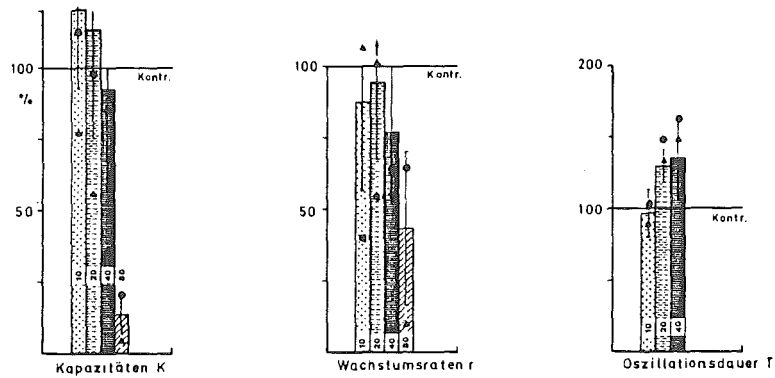


Abb. 6: 4 - Chloranilin

• = Werte von Versuch "München"
 ▲ = Werte von Versuch "Tiberias"

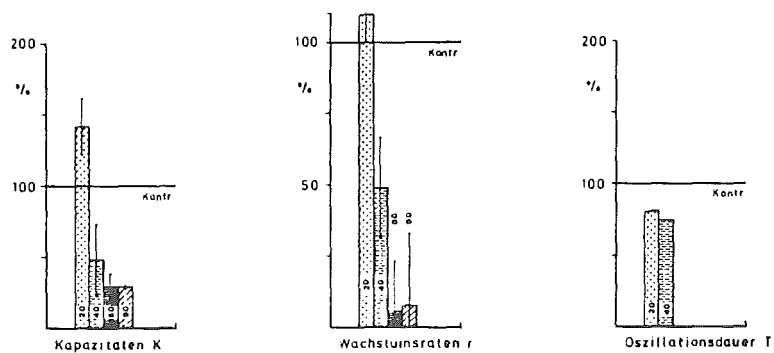


Abb. 7: 2,4 - D

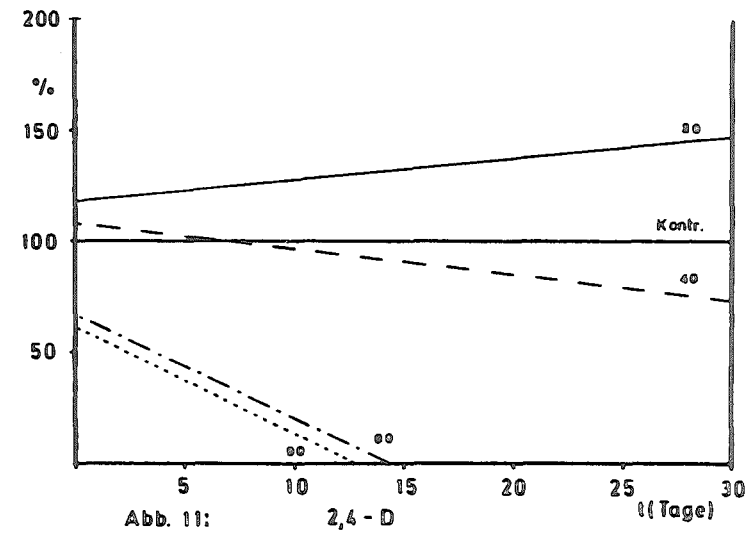
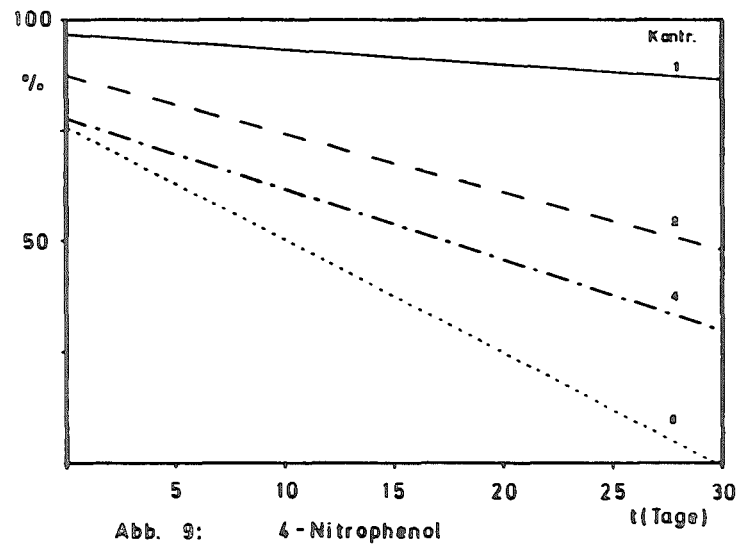
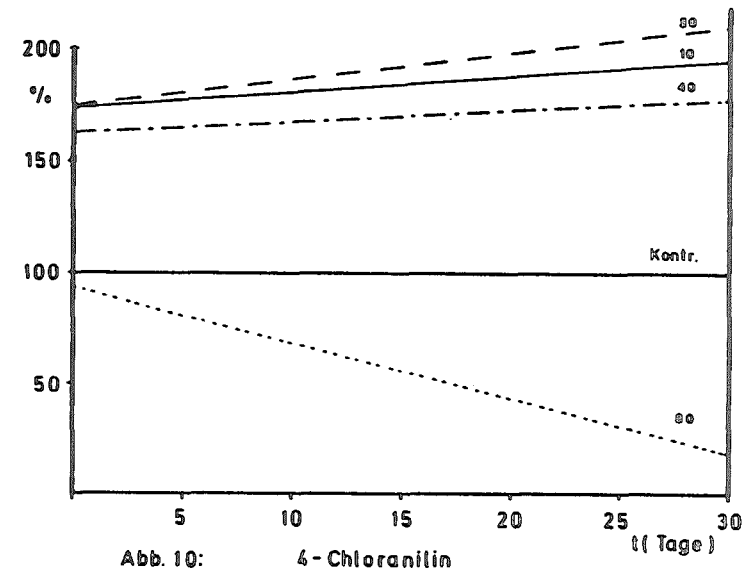
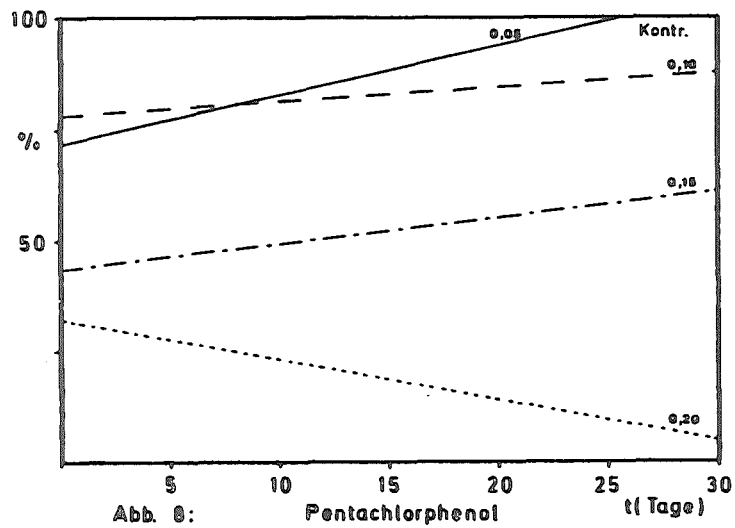


Abb. 8-11: Regressionsdiagramme der Populationsversuche mit PCP, 4-NP, 4-ClA und 2,4-D.

auch bei der niedrigsten Konzentration, nicht adaptieren konnten. Einen Hinweis für diese Verhältnisse bieten auch die Kapazitätswerte (Abb. 5), wobei zu beachten ist, daß sich die Werte benachbarter Konzentrationen statistisch nicht signifikant unterscheiden. Einen anderen Eindruck vermitteln die Populationskurven. Diese erreichen, bei allen Konzentrationen, gegen Ende des Versuchs nahezu gleiches Niveau wie die Kontrollen. Die nicht dargestellten Versuche haben aber gezeigt, daß diese Situation nicht immer auftritt. Alle Versuche mit 4-NP zeigen mehr oder weniger die gleiche Tendenz der Dichteabnahme im Laufe des Versuchszeitraums.

Einen eindeutigen Nachweis der Akkumulation der Substanz in den Tieren oder den Eiern kann jedoch nur durch chemisch-analytische Untersuchungen erbracht werden.

Die durchschnittlichen Kapazitätswerte zeigen bei allen Substanzen das zu erwartende Bild einer abgestuften Abnahme mit Zunahme der Konzentrationen (Abb. 4-7). Auffällig sind hier die erhöhten K-Werte niedriger Konzentrationen von 4-ClA und 2,4-D. Bei den Wachstumsraten und der Fertilität (Abb. 13) sind solche Abstufungen nicht mehr in allen Fällen zu sehen. Die Oszillationsdauer "T" zeigt sowohl einen Anstieg als auch eine Abnahme der Werte. Das Bild der Werte für die Lebensdauer der Tiere (Abb. 12) ist uneinheitlich und läßt darauf schließen, daß dieser Parameter wenig geeignet ist als Meßgröße in einem Ökotoxizitätstest. Die prozentuale Darstellung der Werte bei allen Parametern ermöglicht die Ermittlung von 50%-Werten, die ihrer Aussage nach als "effective dose"-Werte bezeichnet werden können (Tab. 3).

	K	r	Fertilität	Lebensdauer	Eiraten	Ø
PCP	0,13	0,05*	0,18	0,15	0,09	0,14
4-NP	4,8	7,0	-	-	5,8	5,9
4-ClA	60,9	74,0	62,0	-	-	65,6
2,4-D	64,9	49,7	54,8	-	-	56,5

Tab. 3: 50%-Werte aller Parameter bezogen auf die jeweiligen Kontrollen (= 100%). Zahlenangaben in mg/l.

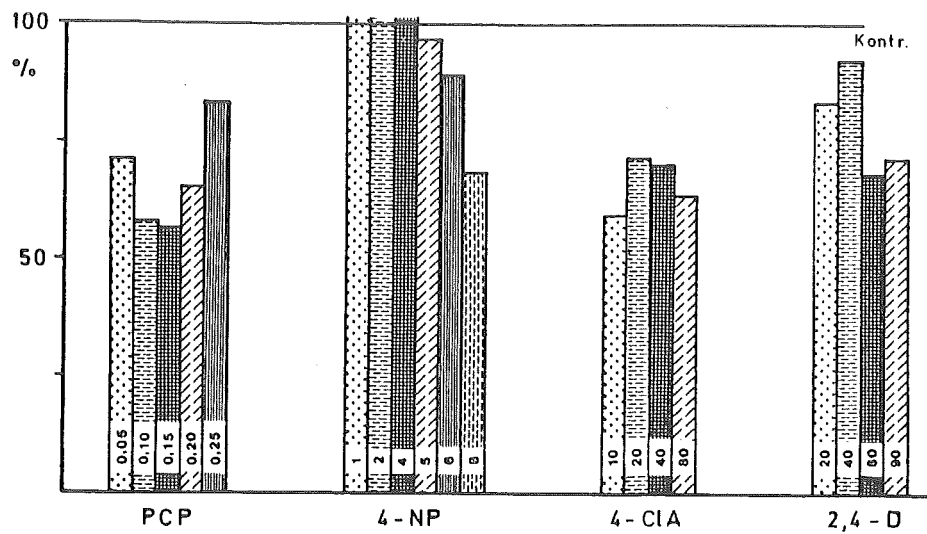


Abb. 12: Lebensdauer

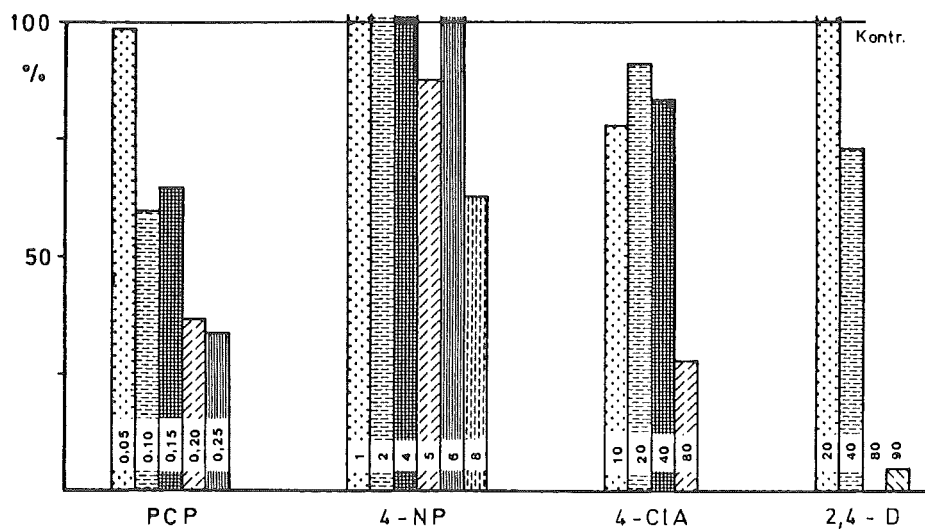


Abb. 13: Fertilität

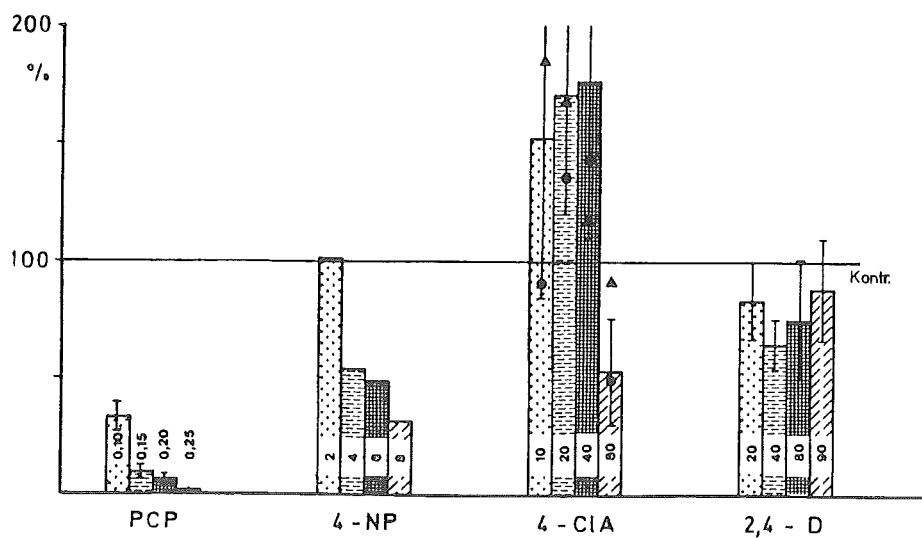


Abb. 14: Eiraten

○ = Werte von Versuch "München"
 ▲ = Werte von Versuch "Tiberias"

Diese Werte geben die Konzentration einer Chemikalie an, bei der die jeweils betrachteten Parameter 50% der Kontrollwerte erreichen und somit ein unbeeinflusstes Populationswachstum nicht mehr gegeben ist. Einige der Werte für Tab. 3 konnten nicht berücksichtigt werden, da fehlende Linearität eine Regressionsberechnung unmöglich machte. Dies gilt besonders für die Oszillationsdauer "T", die sowohl steigende als auch fallende Tendenzen aufweist. Der zu niedrige r-Wert von PCP (*) kann auf den schlechten Beginn einiger Populationsversuche zurückgeführt werden. Obgleich der K-Wert von PCP etwas niedrig ausfällt, dürfte die Kapazität der geeignetste Parameter für eine solche Betrachtungsweise sein. Vergleicht man diese ED 50-Werte mit den LC 50-Werten aus Tab. 1, so fällt auf, daß die ersteren ziemlich deutlich unter den LC 50-Werten liegen. Obwohl keine akute Letalität vorliegt, geben diese ED 50-Werte doch einen Konzentrationsbereich an, ab dem das Populationswachstum deutlich durch die Chemikalien beeinflusst wurde. Bei 4-NP (Abb. 9) und 2,4-D (Abb. 11) können Reaktionen der Testpopulationen auch auf niedrigere Konzentrationen beobachtet werden.

3.2. Die Ring-Versuche

Das in Kap. 2.4. beschriebene Populationsexperiment ist als Ökotoxizitätstest gedacht. Im Hinblick auf eine Reproduzierbarkeit der von uns gefundenen Ergebnisse wurde dieses Experiment in zwei weiteren Instituten wiederholt. Als Vergleichssubstanz wurde 4-Chloranilin gewählt. Diese Substanz hatte sich als relativ problemlos in ihrer Handhabung erwiesen. Sie ist einerseits relativ leicht löslich in Wasser und bei Stammlösungen in hoher Konzentration besteht eine geringe Gefahr der Biodegradation durch Mikroorganismen, andererseits kann sie durch die chemische Analytik auf unkomplizierte Weise, unterivatisiert gaschromatographisch nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser beiden Experimente sind in den Abb. 16-19 dargestellt. Außerdem sind die Werte der einzelnen untersuchten Parameter in den Abb. 6 und 14 durch Symbole gekennzeichnet.

Wie ein Vergleich der Graphiken von Abb. 15 und 16 zeigt, verlief der Versuch "München" erwartungsgemäß sehr ähnlich mit den eigenen Versuchen. Es fehlen die optisch sichtbaren Oszillationen der Kontrolle, die aber auch bei eigenen Versuchen nicht immer vor-

handen waren. Die einzelnen Parameterwerte liegen, bis auf wenige Ausnahmen, innerhalb der durch die Standardabweichungen angegebenen Schwankungsbreiten. Auch die Relationen zur Kontrolle entsprechen, außer bei den Wachstumsraten, den eigenen Ergebnissen. Eine Erklärung für das Ansteigen der Werte von "r" mit einer Konzentrationszunahme ist schwer zu geben. Der Verlauf ist insofern konträr zu eigenen Befunden.

Der Versuch "Tiberias" (Abb. 17) zeigt einen unerwartet irregulären Verlauf zu Beginn des Experiments. Der starke Rückgang der Tierzahlen am ersten Tag ist auf eine schlechte Qualität der Nahrungsalgen zurückzuführen. Ab dem ersten Tag wurden die Versuchstiere mit Algen aus einer gut laufenden Kultur gefüttert. Trotzdem zeigen die einzelnen Ergebnisse, wenn auch in ihren Absolutwerten oft deutlich außerhalb der Schwankungsbreite eigener Werte (K,r), vergleichbare Relationen zur Kontrolle. Die mit 80 mg/l kontaminierten Populationen sind, im Gegensatz zu allen anderen Versuchen mit 4-ClA, schon nach sechs Tagen abgestorben. In diesem Falle wirkte sich, zusätzlich zu der schlechten Qualität der Nahrung am Starttag, auch die Toxizität der Chemikalie aus. Bei beiden Experimenten war ein übermäßig erhöhter Verlauf der Populationskurven bei niedrigen Konzentrationen nicht zu sehen (Abb. 18,19 und 10), obwohl auch hier die Kapazitätswerte bei 10 mg/l absolut höher lagen als die Kontrollwerte. Dies zeigt, daß es sich bei den erhöhten Verläufen der 10 und 20 mg/l-Kurven eigener Versuche nicht um einen Chemikalieneffekt handeln muß.

Die Schwierigkeiten beim Start des Versuchs "Tiberias" beeinflussten auch die Werte der einzelnen Parameter. So liegen die Wachstumsraten sehr hoch nach dem Einbruch der Populationen am ersten Tag. Die Kapazitäten sind zwar sehr niedrig, doch einzelne maximale Dichtewerte liegen deutlich höher als bei dem Versuch "München", was nur durch eine erhöhte Eirate zu erreichen ist (Abb. 14). Die Oszillationsdauer (Abb. 6) zeigt bei allen Versuchen das gleiche Bild. "T" wird länger mit steigender Chemikalienkonzentration. Bei 80 mg/l ergaben sich keine verwertbaren Ergebnisse mehr.

Die Ring-Versuche haben gezeigt, daß sich der Populationsversuch, trotz mancher Schwierigkeiten bei der Durchführung der Experimente, als Testverfahren bei ökotoxikologischen Fragestellungen gut

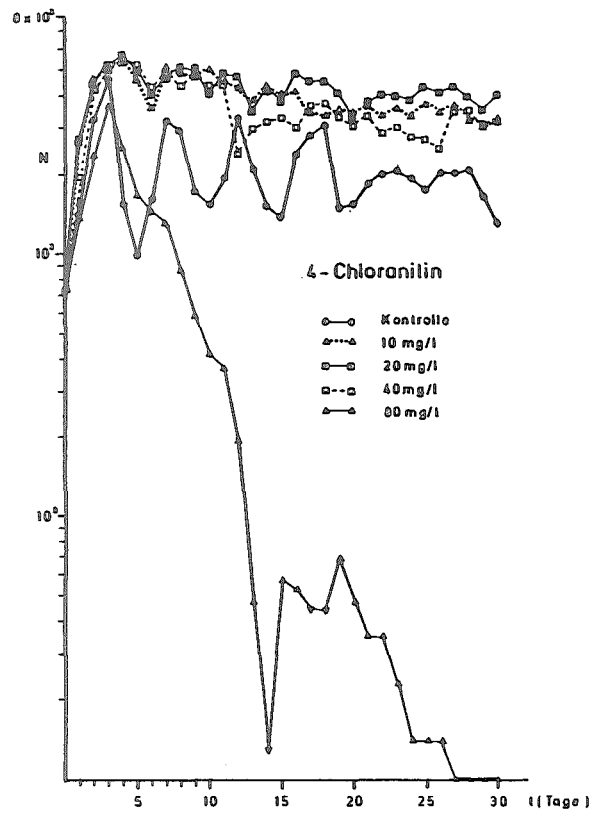


Abb. 15: Mittelwertkurven eines eigenen Populations-Versuchs mit 4-CLA

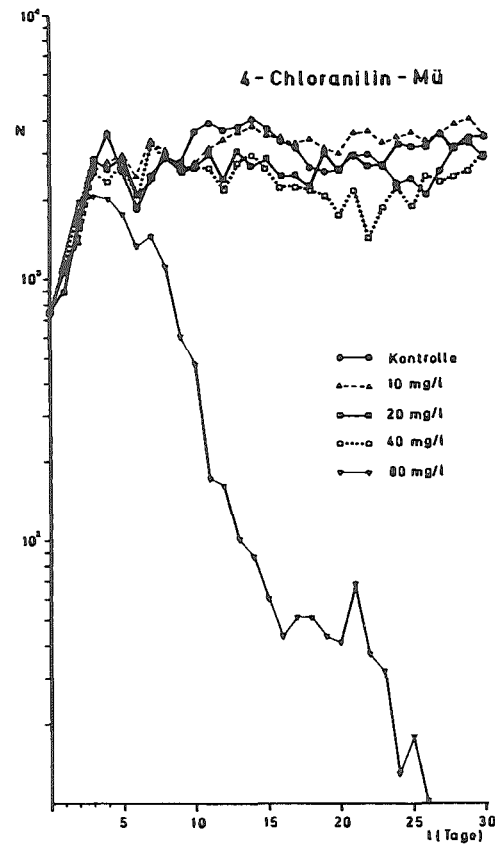


Abb. 16: Populationskurven des Ringversuchs "München"

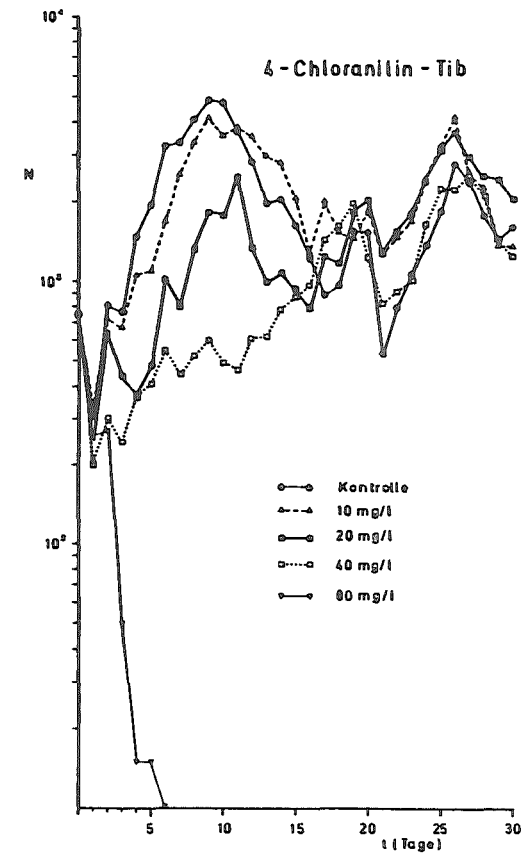


Abb. 17: Populationskurven des Ringversuchs "Tiberias"

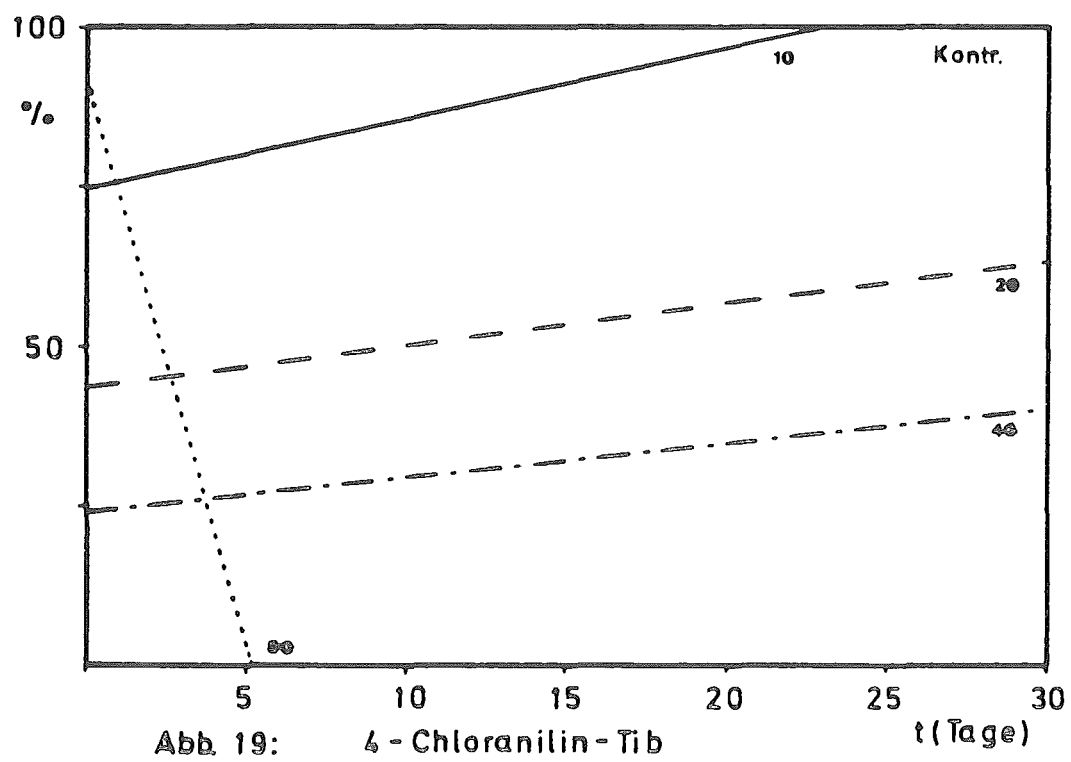
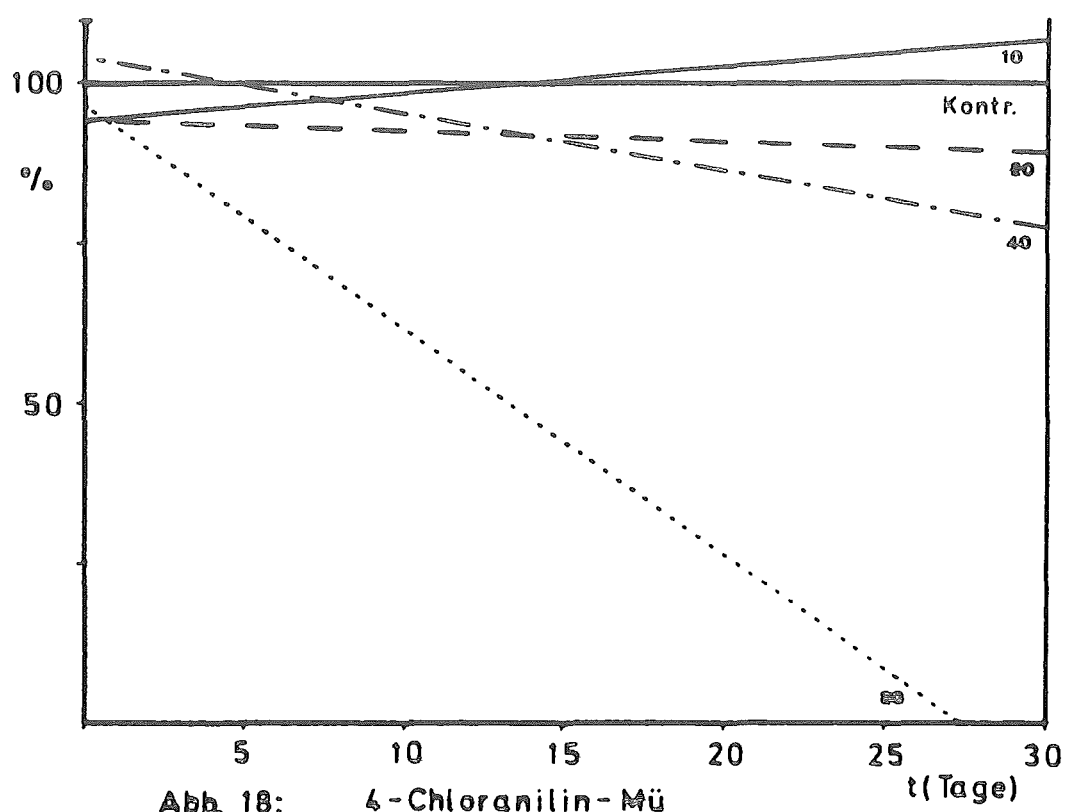


Abb. 18 und 19: Regressionsdiagramme der Ringversuche "München" (Mü) und "Tiberias" (Tib).

eignet und somit empfohlen werden kann. Einige Voraussetzungen sind allerdings unerläßlich, was die Erfahrungen mit den Ring-Versuchen offenbarten: Der jeweilige Bearbeiter sollte vertraut sein mit der Biologie, insbesondere der Populationsbiologie der Rotatorien. Erfahrungen im Umgang mit den Tieren, z.B. das Zählen mit einer Glaspipette, das Umsetzen über Siebe und die Kultivierung, aber auch mit den Algen (Kultivierung), sollten unbedingt durch Üben erworben werden um ein Gelingen der Experimente zu garantieren. Liegen diese Erfahrungen vor, so wäre eine Übergabe des Verfahrens zur Ausführung durch Technische Angestellte absolut möglich.

3.3. Chemische Analytik

Die Experimente wurden, wie in Kap. 2.6. geschildert, von chemischen Analysen begleitet. Hiermit sollten einerseits die Konzentrationen der Stammlösungen kontrolliert werden, andererseits Hinweise auf das Schicksal der Substanzen im Testmedium gewonnen werden. Tab. 4 gibt eine Zusammenfassung aller Meßwerte für die entsprechenden Substanzen wieder.

P C P		4 - N P		4 - C l A				2,4 - D	
N	A	N	A	N	A	Mü,A	Tib,A	N	A
0,10	0,14	2	2,1	10	7,7	3,3	9,3	20	21,6
0,15	0,19	4	4,4	20	17,9	7,0	20,3	40	44,2
0,20	0,26	6	5,1	40	37,9	20,2	40,8	80	83,8
0,25	0,27	8	6,5	80	75,9	47,0	85,0	90	98,6

Tab. 4: Durchschnittswerte (A) der chemisch-analytischen Bestimmung nominal vorgegebener Konzentrationen (N) aus den Experimenten. Zahlenangaben in mg/l.

Die Einzelwerte variieren bei allen Substanzen ziemlich stark. Es liegt somit kein schlüssiger Hinweis auf eine mögliche Biodegradation im Testmedium vor. Eine Akkumulation der Substanzen im Testmedium, wie die Werte von PCP und 2,4-D vermuten lassen, kann auch ausgeschlossen werden, da das Medium täglich erneuert wurde und die Substanzen nur einmal täglich appliziert wurden. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Konzentrationen aller Chemikalien nur geringfügigen Veränderungen ausgesetzt waren,

zumal eine Untersuchung der Adsorption von PCP und 4-NP an Glaswänden, Algen und Rädertieren ergab, daß es sich um vernachlässigbar geringe Mengen handelt (PCP: 0-5 ng/cm²; 4-NP: 0-4 ng/cm²). Der Nachweis von Metaboliten in den Testmedien führte zu keinen endgültigen Ergebnissen. Neutrale Metabolite von PCP und 4-NP konnten nicht nachgewiesen werden (Nachweisgrenze: 4% der eingesetzten Mengen). Das gleiche gilt für phenolische Metabolite von PCP. Der Veresterungsextrakt des mit 4-NP behandelten Mediums enthielt eine Substanz, bei der es sich um Phenol oder ein Catechol handeln könnte.

Im Falle von 4-ClA konnte eine Nebenkomponekte bestätigt werden, deren Struktur nicht eindeutig geklärt werden konnte, die aber einen chlorierten Benzolring enthält.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den folgenden Personen für ihre Bereitschaft an den Ring-Versuchen teilzunehmen bzw. die dazugehörigen Experimente durchzuführen bedanken:

Prof. Dr. Jürgen Jacobs, Tanja Gschlößl und Josef Platzek (Zoologisches Institut der Universität München).

Dr. Moshe Gophen und Dr. David Wynne (Kinneret Limnological Laboratory, Tiberias, Israel).

4. Literatur

BORAAS, M.E. (1983): Population dynamics of food-limited rotifers in two-stage chemostat culture. Limnol. Oceanogr. 28, 3: 546-563.

BRAUER, M. (1983): Wiederholte Filtrierratenbestimmung an einzelnen Brachionus rubens (Rotatoria) in Abhängigkeit vom Alter der Tiere und unterschiedlichen Nahrungskonzentrationen. Dissertation an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt/M.

BUIKEMA, A.L.(Jr.), M.J. MCGINNIS, J. CAIRNS (Jr.) (1979):

Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review of recent literature. Marine Environ. Res. 2: 87-181.

EL-DIB, M.A. (1971): J.Assoc.Offic.Anal.Chemists 54: 1383-1387.

HALBACH, U. (1970): Einfluß der Temperatur auf die Populationsdynamik des planktischen Rädertieres Brachionus calyciflorus Pallas. Oecologia (Berl.) 4: 176-207.

HALBACH, U. (1973): Life table data and population dynamics of the rotifer Brachionus calyciflorus Pallas as influenced by

- periodically oscillating temperatures. In: WIESER, W. (ed.), Effects of temperature on ectothermic organisms: 217-228. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- HALBACH, U. (1979): Introductory remarks: strategies in population research exemplified by rotifer population dynamics. Fortschr. Zool. 25, 2/3: 1-27.
- HALBACH, U. (1984): Population dynamics of rotifers and its consequences for ecotoxicology. Hydrobiol. 109: 79-96.
- HALBACH, U. und HALBACH-KEUP, G. (1974): Quantitative Beziehungen zwischen Phytoplankton und der Populationsdynamik des Rotators *Brachionus calyciflorus* Pallas. Befunde aus Laboratoriumsexperimenten und Freilanduntersuchungen. Arch. Hydrobiol. 73: 273-309.
- HALBACH, U., M. SIEBERT, M. WESTERMAYER und C. WISSEL (1983): Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. Ecotoxicol. Environm. Safety 7: 484-513.
- PILARSKA, J. (1977): Eco-physiological studies on *Brachionus rubens* Ehrbg. (Rotatoria). II. Reproduction and respiration. Pol. Arch. Hydrobiol. 24, 3: 329-341.
- SCHLÖSSER, U. (1982): List of strains. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 95: 181-276.
- STÖRKEL, K. (1984): Toxikologische Untersuchungen an einer zweistufigen Labornahrungskette. Ber. ökol. Aussenst. Schlüchtern Bd. 11.
- WISSEL, C., K. BEUTER und U. HALBACH (1980): Analyse der Populationsdynamik von Rotatorien mittels Korrelationsfunktionen. Verh. Ges. Ökol., Freising-Weihenstephan 1979: 271-279.
- Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts, die nicht im Bericht erwähnt werden:
- HALBACH, U., M. SIEBERT, J. KLAUS, C. WISSEL, K. BEUTER und M. DELION (1981): Die Populationsdynamik von Rotatorien als Bioindikator für subletale Schadstoffwirkungen am Beispiel von Pentachlorphenol (PCP). Verh. Ges. Ökol., Berlin 1980, Bd IX: 261-267.
- HALBACH, U., M. SIEBERT, C. WISSEL, J. KLAUS, K. BEUTER und M. DELION (1981): Population dynamics of rotifers as bioassay tool for toxic effects of organic pollutants. Verh. Internat. Verein. Limnol. 21: 1147-1152.

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7233)

Testapparatur für Effekte von Chemikalien auf
Plankton - Lebensgemeinschaften

von

Dr. K.-U. Störkel

Zoologisches Institut im Fachbereich Biologie
der J. W. Goethe - Universität Frankfurt

Vorhabenleiter:

Prof. Dr. Ch. Wissel

Marburg

März 1984

Zusammenfassung

Eine zweistufige Labornahrungskette für ökotoxikologische Langzeit-Untersuchungen wird beschrieben. Das System besteht aus zwei Algen-Chemostat-Kulturen (*Scenedesmus acutus*), einer Verdünnungseinheit und vier Gruppen von Kulturgefäßen mit *Daphnia magna* als Filtrierer. Einer der Chemostaten ist mit der Testsubstanz kontaminiert. Die Algensuspension wird kontinuierlich mit sterilem Wasser vermischt und direkt in die Kulturgefäße gepumpt. Die Daphnien-Kulturen sind verschiedenen Kombinationen von Futteralgen und Testsubstanz ausgesetzt: 1. Algen und Verdünnungswasser sind kontaminiert. Dies entspricht der natürlichen Belastungssituation. 2. Nur die Algen sind kontaminiert. Der Nahrungseffekt auf die Tiere wird bestimmt. 3. Nur das Verdünnungswasser ist belastet. 4. Zur Kontrolle sind Algen und Wasser unbelastet. Das System wurde mit PCP, 4-Nitrophenol, 4-Chloranilin, 2,4-D, Phenol und Atrazin getestet. Die Effekte auf das Populationswachstum der Daphnien und die Absorptionsänderungen der Algenkulturen wurden gemessen und diskutiert.

Summary

An artificial two-step food chain for long term ecotoxicological experiments is described. The system consists of two chemostats for culturing algae (*Scenedesmus acutus*), a dilution unit, and four groups of experimental vessels with filter-feeders (*Daphnia magna*). One of the chemostats is contaminated with the testing substance. The algal suspension of the chemostat is continuously mixed with sterile water, and pumped directly into the experimental vessels. The vessels for the test animals receive different combinations of algae and testing substance: 1. Algae and water are contaminated. This situation is a model of natural conditions of pollution. 2. Only the algae are contaminated. The food effect on the animals is measured. 3. Only the dilution water is contaminated. 4. For control, food and medium are uncontaminated. The system was tested with PCP, 4-Nitrophenol, 4-Chlorobenzeneamine, 2,4-D, Phenol, and Atrazin. The effects on population growth of the daphnids and the changing of absorption of the algal suspension were measured and discussed.

1. Einleitung

In dem vorliegenden Bericht wird ein Testsystem beschrieben, das modellhaft einen zentralen, aber überschaubaren Ökosystem-Ausschnitt eines stehenden Gewässers simuliert. Im Einzelnen wird die Beziehung zwischen einem planktonischen Primärproduzenten, *Scenedesmus acutus* MEYEN, und einem filtrierenden Primärkonsumenten, *Daphnia magna* STRAUS, in einem offenen, direkt gekoppelten Durchflußsystem untersucht. Die Konzeption dieses Systems erlaubt direkte subletale Effekte eines Schadstoffes auf die Zooplanktonpopulation durch die Aufnahme der Substanz über die Kiemen oder das Integument von indirekten Wirkungen zu trennen. Solche indirekten Wirkungen können in einer Veränderung der Primärproduktion durch die Chemikalie, oder in einer qualitativen Veränderung der Futteralgen z.B. durch Akkumulationsprozesse bestehen.

2. Material und Methode

Kultur der Versuchsorganismen

Die Dauerkultur der Daphnien erfolgte nach der von LAMPERT (1975) beschriebenen Durchflußmethode bei 20°C. Als Kulturmedium kam belüftetes Leitungswasser zum Einsatz, das vorher durch Aktivkohle gereinigt wurde. Dieses aufbereitete Wasser diente in allen weiteren Versuchen mit Daphnien als Verdünnungs- bzw. Hälterungswasser (pH-Wert: 8,1, Sauerstoffgehalt: 8,9 mg/l, Gesamthärte: 13,2°dH, Leitfähigkeit: 578 µS).

Scenedesmus acutus (Stamm 276-3a der Sammlung von Algenkulturen, Göttingen) ist auch über längere Zeit als alleinige Nahrungsquelle für *Daphnia magna* geeignet. Als Nährlösung für alle Algenkulturen ist das von MÜLLER (1972) angegebene Medium verwendet worden.

Diese Lösung hat eine relativ niedrige Gesamtkonzentration an Ionen und simuliert daher weitgehend den Salzgehalt natürlicher Gewässer. Für die Dauerkultur wurden die Algen in 50 ml Erlenmeyer-Kolben mit Steri-Stopfen unter statischen Bedingungen bei 15°C und etwa 4000 Lux bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8 Stunden gehalten. Die Algensuspension der Chemostat-Kulturen des Testsystems bestand aus Zellaggregaten verschiedener Größe und Einzelzellen. Im Mittel waren 80% der Zellen in Coenobien aus 8 Zellen zusammengefaßt. 7% der Zellen kamen in Form von 4zelligen

Coenobien, 2% als Doppelzellen und 11% als Einzelzellen vor. Die Zellgröße einer Einzelzelle betrug 13 mal 3 μm .

Das Testsystem

Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Testapparatur. Die Testorganismen befinden sich in einem offenen Durchflußsystem, das mehrere Bauelemente erkennen läßt:

- Chemostate mit Überlauf und Versorgungsteilen
- Dosiereinrichtung
- Daphnien-Kulturen mit Versorgungsteilen

Im Folgenden sollen Aufbau, Funktion und Handhabung der einzelnen Bauelemente beschrieben werden.

Die Versorgungsteile der zwei Algen-Kulturen bestehen aus 20 l Steilbrust-Flaschen, die über ein Druckfiltrations-System mit steriler Nährlösung (NL) aufgefüllt werden können. Die Nährlösung wird mit einer regulierbaren Peristaltikpumpe (PP) in die Chemo-statgefäße befördert. Die Zuflußraten (1500 ml/Tag) lassen sich

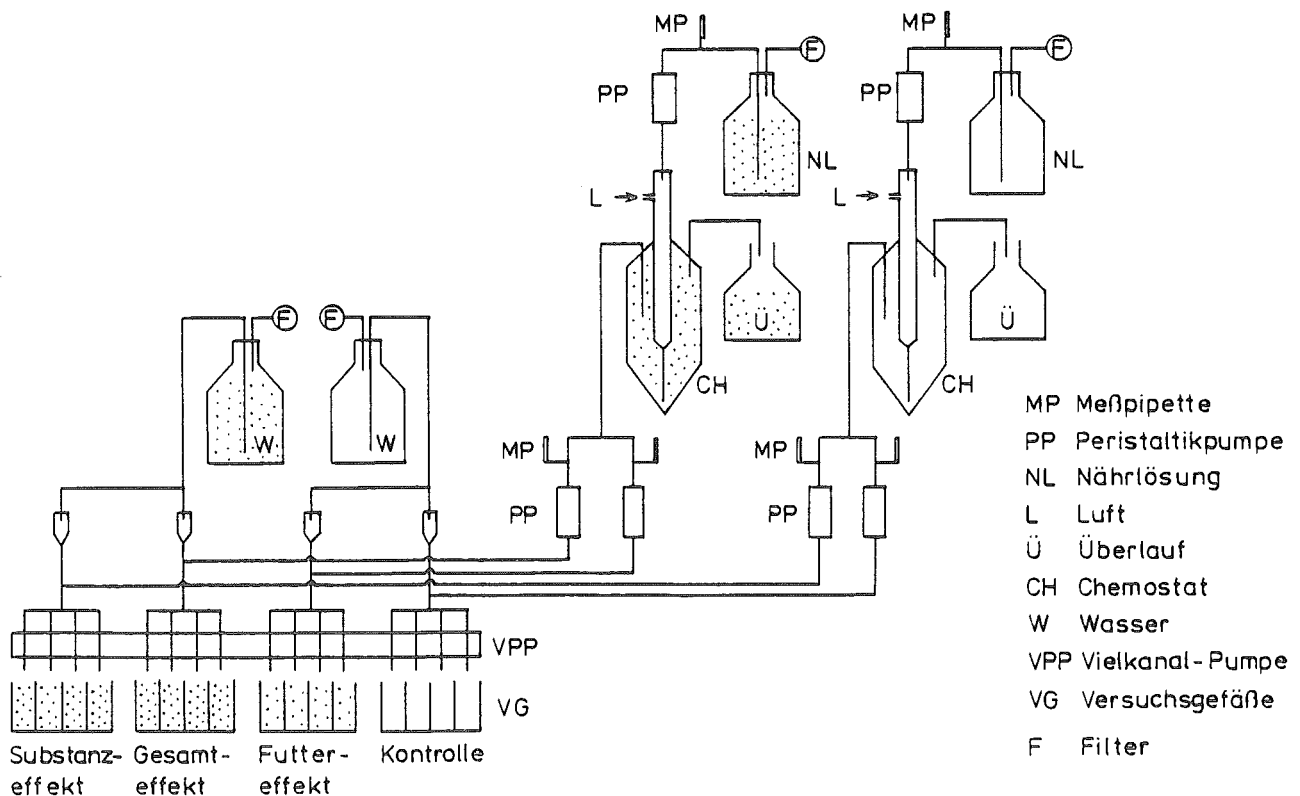


Abb. 1: Schematische Darstellung des Testsystems

mit Hilfe von Meßpipetten (MP) überprüfen. Die Chemostat-Kulturen werden in unten spitz zulaufenden, zylindrischen Weithals-Reaktionsgefäßen bei Dauerlicht (5000 Lux) betrieben. Die Deckel der Gefäße sind mit Gewinde-Öffnungen versehen, durch die mit Hilfe von Gleitverbindungsverschlüssen ein Zugang zu dem Reaktionsraum gegeben ist. Die Luftzufuhr ist mit einem Tropfgefäß für die Nährlösung kombiniert, das mit seinem zu einem dünnen Rohr ausgezogenen Ende bis in die Spitze des Reaktionsgefäßes hinabreicht. Die aufsteigenden Luftblasen führen zu einer kräftigen Turbulenz in der Kultur und verhindern weitgehend das Absetzen der Algen in Toträumen. Zur Belüftung dient Raumluft, die mit Hilfe von Membran-Luftpumpen durch zwei in Reihe angeordnete Glasfaserfilter in die Kulturgefäße gedrückt wird. An einem Rotameter kann die Luftzufuhr (Belüftungsrate: 120 l/h) reguliert werden. Einzelheiten des Belüftungssystems sind nicht in der Abb. 1 dargestellt worden. Das Volumen der Algen-Kulturen bleibt trotz der zutropfenden Nährlösung konstant, da der Überschuß mittels des Belüftungsdruckes durch ein Überlaufröhrchen in ein Auffanggefäß (Ü) geblasen wird. Die Wachstumsrate der Algen ist bei Konstanz der abiotischen Randbedingungen - Temperatur, Beleuchtungsstärke, Belüftungsrate und Nährlösungsdurchfluß - weitgehend zeitunabhängig. Eine solche kontinuierliche Algen-Kultur weist daher für einige Monate eine konstante Primärproduktion auf (Biomasseproduktion: 82,7 mg Trockengewicht pro Tag, bei 20°C). In den Überlaufgefäßen läßt sich die Qualität der Algen, die abhängig von der Schadstoffzugabe in das Nährmedium verschieden sein kann, untersuchen. Mit Mikrodosierpumpen (PP) wird ein kleiner Teil des Chemostaten-Inhalts entnommen und einer größeren Menge sterilfiltrierten Wassers (W) zudosiert, das die Versuchsgefäße (VG) für die Daphnien-Kulturen durchfließt. Der Durchfluß pro VG beträgt 600 ml/Tag, wobei 72 ml (=12%) auf die Algensuspension entfallen. Als Versuchsgefäße für die Konsumenten-Stufe sind 2 l Bechergläser gewählt worden, in die eine mit einem Schaumstoff-Filter versehene Überlaufeinrichtung eingeschmolzen ist. Die Gefäße mit den Versuchstieren werden vier verschiedenen Kombinationen von Futteralgen und Testsubstanz ausgesetzt. Eine Vielkanal-Peristaltikpumpe (VPP) spaltet diese Kombinationen in jeweils vier Parallelen auf:

In dem Ansatz für den Gesamteffekt stammen die Algen aus einem mit einer Testsubstanz kontaminierten Chemostaten. Das Verdünnungswasser ist ebenfalls kontaminiert. Diese Situation entspricht den natürlichen Bedingungen, unter denen die Kompartimente räumlich nicht getrennt sind. Die Tiere reagieren auf die qualitative und quantitative Veränderung des Futters durch die Chemikalie und auf die direkte Wirkung des Stoffes.

In dem Substanzeffekt-Ansatz ist nur das Verdünnungswasser kontaminiert. Vorallem der direkte Einfluß der Testsubstanz auf die Tiere wird hier untersucht. Bei diesem Ansatz muß dem Hälterungswasser 12% mehr Testsubstanz zugefügt werden, damit der Verdünnungseffekt durch die zudosierten, unkontaminierten Algen kompensiert wird. In dem Ansatz für den Algeneffekt ist das Verdünnungswasser unkontaminiert. Erfasst wird hier der Einfluß des kontaminierten Futters auf die Tiere.

Der letzte Ansatz mit unkontaminiertem Wasser und Futter dient der Kontrolle.

Durch das Durchflußsystem ist eine kontinuierliche Zugabe der Testsubstanz möglich. Auch andere Schwierigkeiten statischer Systeme, wie z.B. die Anreicherung von Stoffwechselendprodukten werden vermieden. Das System simuliert eine konstante Primärproduktion, die nur von der Testsubstanz, nicht aber von der Zahl der Tiere abhängt. Die Futtermenge, die jedem einzelnen Tier zur Verfügung steht, ist aber abhängig von der Größe der Populationen in den Versuchsgefäßen. Das Populationswachstum findet daher unter futterlimitierten Bedingungen statt.

Die Versorgungsteile für die Daphnien-Kulturen bestehen ebenfalls aus 20 l Steilbrustflaschen, die nach dem Autoklavieren über Druckfiltrationssysteme (F) mit sterilem Hälterungswasser aufgefüllt werden. Die Trennung der Algen- und Daphnien-Kompartimente verhindert eine völlige Ausrottung der Futterart und simuliert deshalb natürliche Verhältnisse besser als kleine geschlossene Systeme.

Als Meßparameter für die Wirkung der Chemikalien sind Umfang, Zusammensetzung und Trockengewicht der Daphnienpopulationen nach 21 Tagen (Anfangsdichte: 20 Jungtiere pro Versuchsgefäß, nicht älter als 24h) bei 20°C und das Extinktionsverhalten der Chemo-stat-Kulturen (720 nm) gewählt worden.

3. Ergebnisse und Diskussion

In den Abb. 2 bis 14 und der Tab. 1 sind exemplarisch einige Ergebnisse der Versuche mit Referenzchemikalien dargestellt. Für jeden einzelnen Versuch wurden die täglichen Extinktionsmessungen der Algenkulturen zu einem Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung über den Versuchszeitraum zusammengefaßt (Abb.2). In den Abbildungen über die Reproduktion von *D. magna* unter dem Einfluß von Testchemikalien (Abb. 3-14) sind für jeden Testparameter die Mittelwerte aus den vier Parallelen in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die Buchstaben G,S,A und K unter den Säulen stehen für Gesamteffekt-, Substanzeffekt-, Algeneffekt- und Kontroll-Ansatz. In dem mittleren Diagramm "Zahl der Daphnien" können an den drei zusammenstehenden Säulen Informationen über die Größenstruktur der Population dieses Ansatzes abgelesen werden: Die jeweils linken Säulen entsprechen der Anzahl der Tiere,

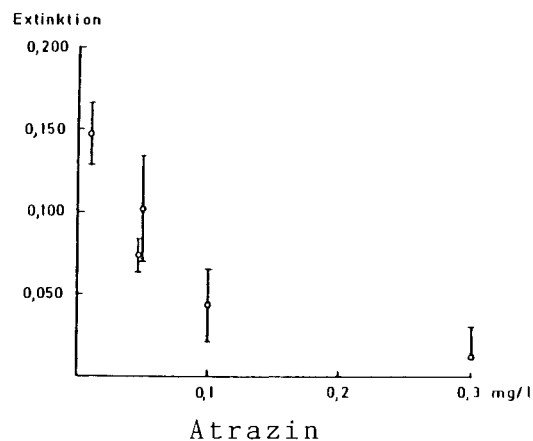
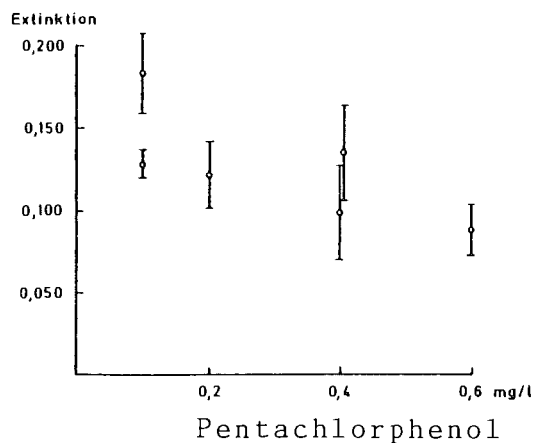
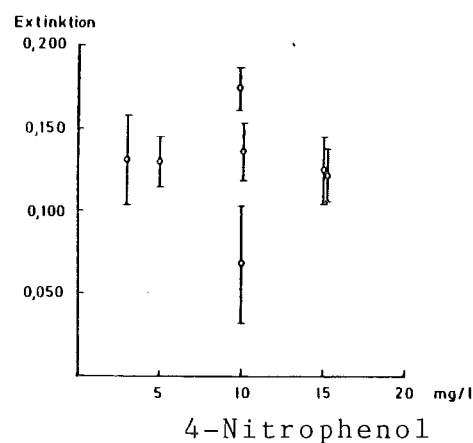
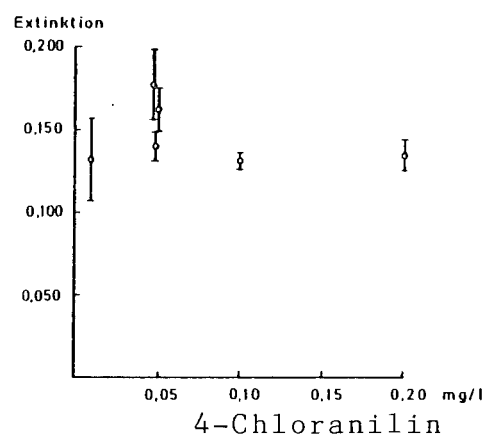


Abb. 2: Extinktionswerte der Algenchemostate in Abhängigkeit von der Konzentration an Testchemikalien.

die größer als 2,1 mm sind und sind mit ">" gekennzeichnet. Ab dieser Größe können Eier im Brutraum beobachtet werden. Die mittleren Säulen entsprechen den juvenilen Tieren, die kleiner als 2,1 mm sind. Sie sind mit "<" symbolisiert. Mit dem Summenzeichen "Σ" sind die rechten Säulen gekennzeichnet, die der Gesamtzahl der Tiere entsprechen. Als Streuungsmaß ist in allen Fällen die Standardabweichung eingetragen.

Die Rohdaten der Reproduktionsversuche mit den Daphnien, bestehend aus den vier Parallelen von Gesamteffekt-, Substanzeffekt-, Algen-effekt- und Kontroll-Ansatz, wurden für jeden einzelnen Parameter (Trockengewicht, Daphnien >2,1 mm, Daphnien <2,1 mm, Gesamtzahl der Daphnien, Zahl der Eier) nach der Methode der linearen, orthogonalen Kontraste statistisch bearbeitet (WEBER 1980). Es wurden drei Kontraste gebildet, die im Folgenden definiert werden:

Bei dem Kontrast L1 sind die Mittelwerte der Ansätze zusammengefaßt, die Algen aus dem gleichen Chemostaten erhalten:

$L1 = (x_G + x_A) - (x_S + x_K)$, wobei x einen der Testparameter repräsentiert und die Buchstaben G, A, S und K die schon genannte Bedeutung haben. Ist L1 signifikant von Null verschieden, haben die beiden Chemostat-Kulturen, die Gesamt- und Algeneffekt-Ansatz, bzw. Substanzeffekt- und Kontroll-Ansatz versorgen, einen entscheidenden Einfluß für die Mittelwertsdifferenzen gehabt. Der Kontrast L2 berücksichtigt das unterschiedliche Verdünnungswasser der Ansätze: $L2 = (x_G + x_S) - (x_A + x_K)$. Wenn L2 signifikant von Null abweicht, hat das kontaminierte Verdünnungswasser von Gesamt- und Substanzeffekt-Ansatz zu wesentlichen Mittelwertsdifferenzen geführt. Der Kontrast L3 zielt auf mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Einfluß des Verdünnungswassers und der Qualität der Algen: $L3 = (x_G - x_S) - (x_A - x_K)$. Die so gewählten Kontraste erlauben also Einblicke in die Variationsursachen.

Bei Tabelle 1, die die statistische Bearbeitung der Reproduktionsdaten wiedergibt, werden mit "-" nicht-signifikante Kontraste gekennzeichnet. Signifikante Kontraste werden mit "+" bei 5% Irrtumswahrscheinlichkeit und mit "++" bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit charakterisiert. Auf weitere varianzanalytische Untersuchungen und multiple Mittelwertsvergleiche (Tukey-Test) kann hier nicht eingegangen werden (STÖRKEL 1984).

Im Folgenden sollen die Versuchsergebnisse angesprochen werden, wobei leider viele Aspekte unberücksichtigt bleiben müssen. Eine

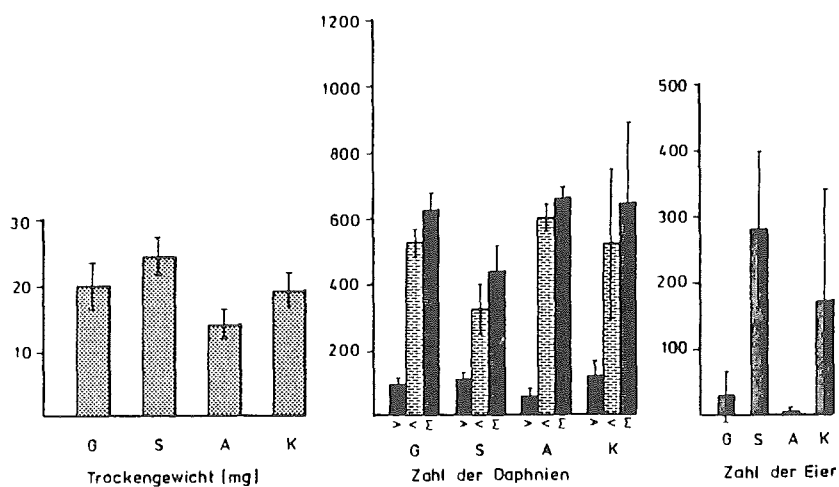


Abb. 3: Reproduktion von *D. magna*, 4-Chloranilin: 0,01 mg/l

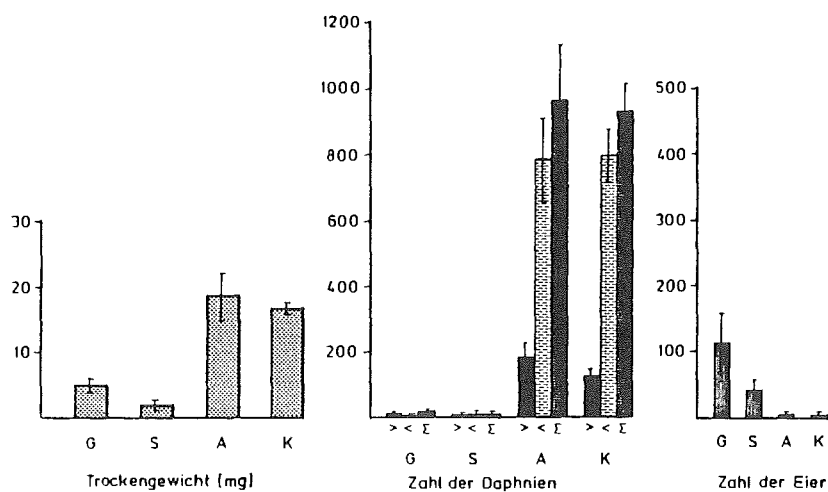


Abb. 4: Reproduktion von *D. magna*, 4-Chloranilin: 0,05 mg/l

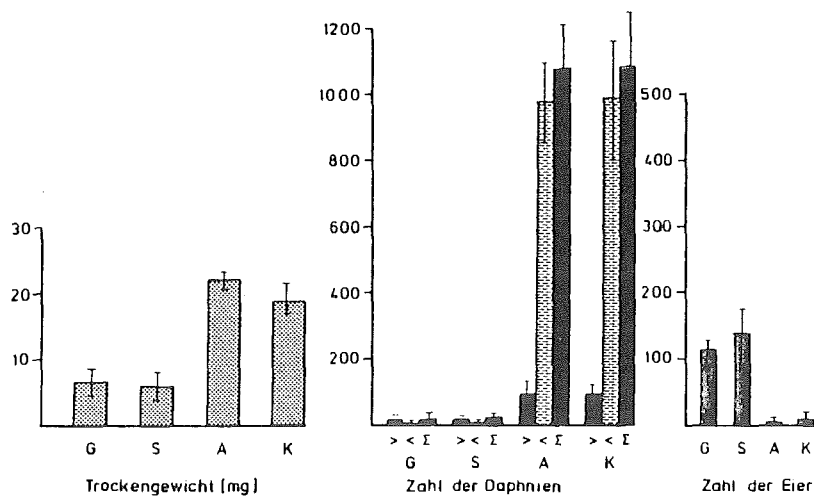


Abb. 5: Reproduktion von *D. magna*, 4-Chloranilin: 0,05 mg/l

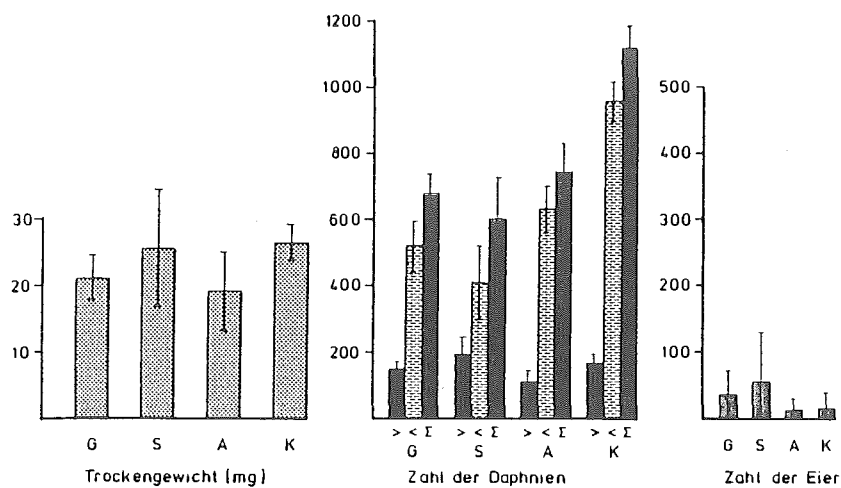


Abb. 6: Reproduktion von *D. magna*, 4-Nitrophenol: 5,0mg

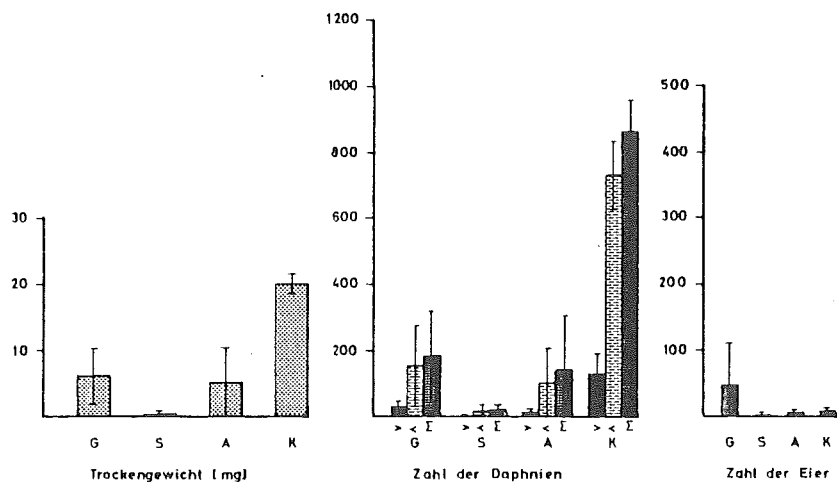


Abb. 7: Reproduktion von *D. magna*, 4-Nitrophenol 10,0 mg/l

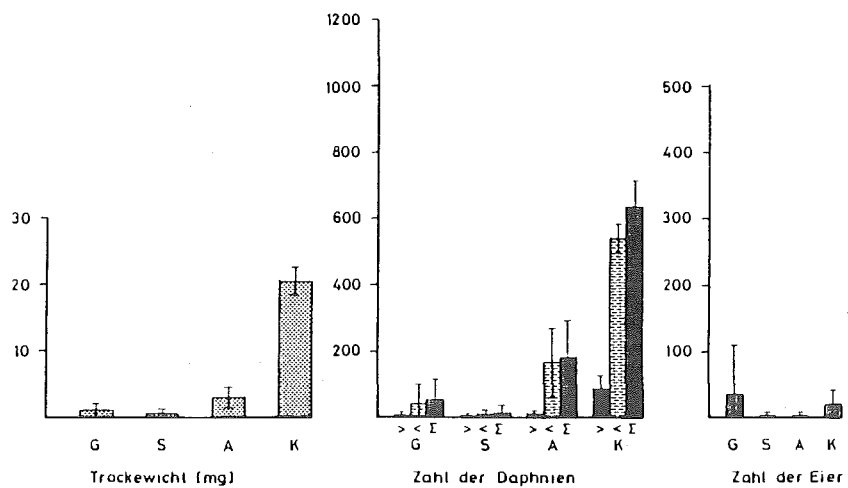


Abb. 8: Reproduktion von *D. magna*, 4 - Nitrophenol 15,0 mg/l

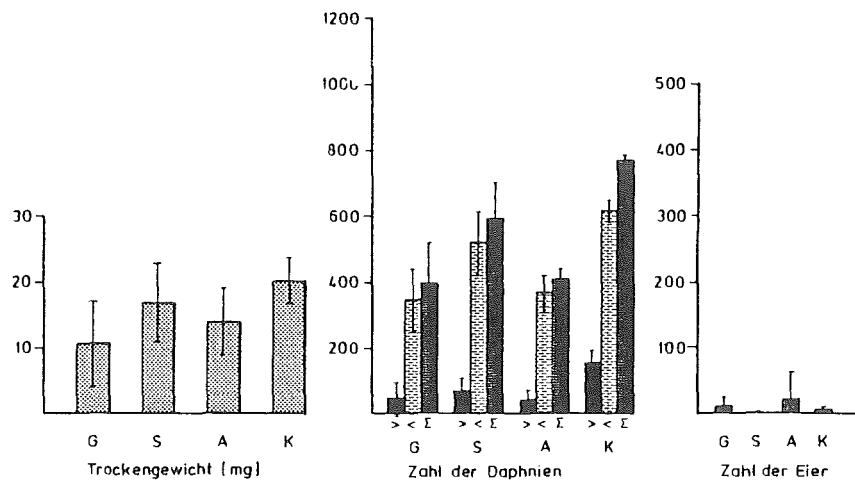


Abb. 9: Reproduktion von *D. magna*, Pentachlorphenol: 0.2 mg/l

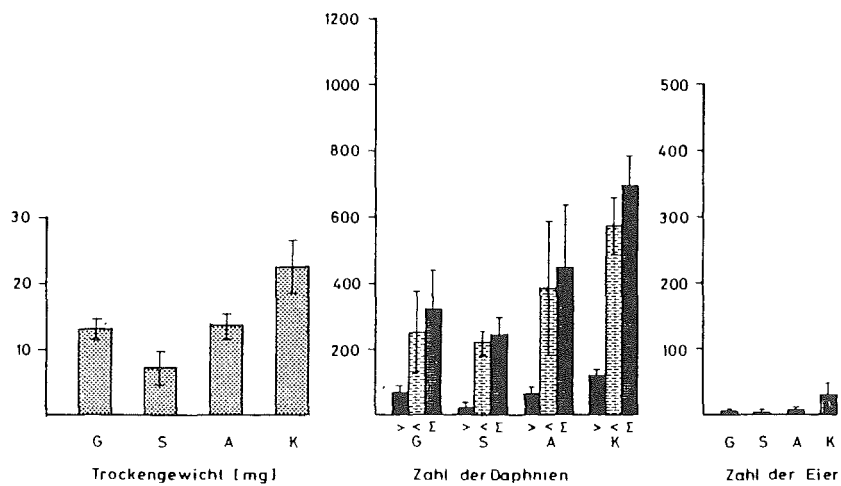


Abb. 10: Reproduktion von *D. magna*, PCP 0.4 mg/l

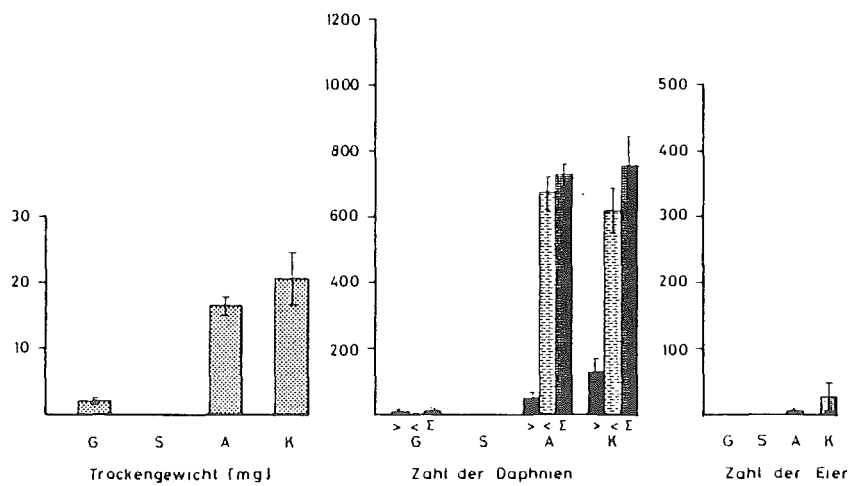


Abb. 11: Reproduktion von *D. magna*, PCP 0.6 mg/l

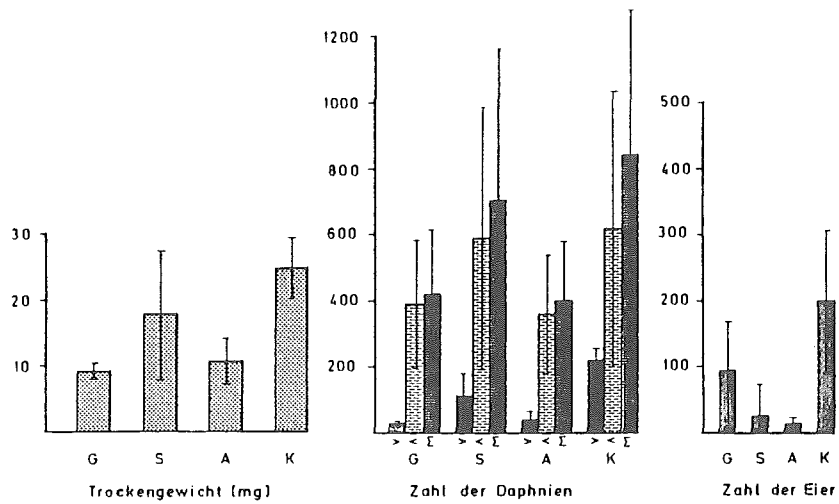


Abb.12: Reproduktion von *D. magna*, Atrazin 0,05 mg/l

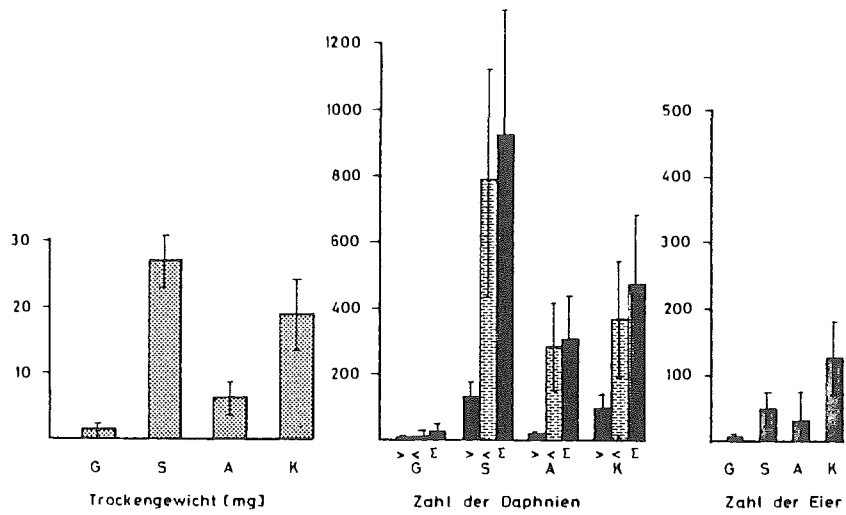


Abb. 13: Reproduktion von *D. magna*, Atrazin 0,1 mg/l

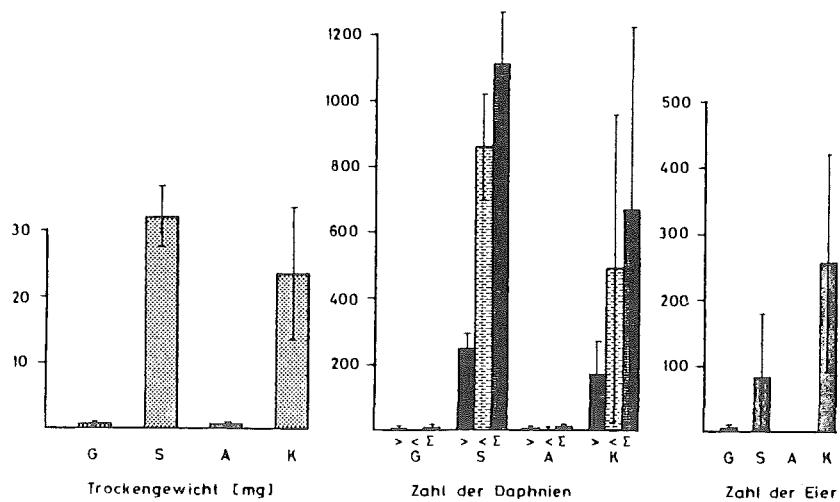


Abb. 14: Reproduktion von *D. magna*, Atrazin 0,3 mg/l

Tabelle 1: Statistische Bearbeitung der Daten aus den Reproduktionsversuchen

Abb. Nr.	Konz. mg/l	Lineare- Kontraste	Trocken- gewicht	Zahl der Daphnien > 2,1 mm	Zahl der Daphnien < 2,1 mm	Gesamt- zahl der Daphnien	Zahl der Eier
<u>4-Chloranilin</u>							
3	0,01	L1	++	+	+	-	++
		L2	++	-	+	-	-
		L3	-	-	-	-	-
4	0,05	L1	+	+	-	-	+
		L2	++	++	++	++	++
		L3	-	-	-	-	+
5	0,05	L1	-	-	-	-	-
		L2	++	++	++	++	++
		L3	-	-	-	-	-
<u>4-Nitrophenol</u>							
6	5,0	L1	-	+	+	++	-
		L2	-	-	++	++	-
		L3	-	-	++	++	-
7	10,0	L1	+	++	++	++	-
		L2	++	++	++	++	-
		L3	++	++	++	++	-
8	15,0	L1	++	++	++	++	-
		L2	++	++	++	++	-
		L3	++	++	++	++	-
<u>Pentachlorphenol</u>							
9	0,2	L1	+	++	++	++	-
		L2	-	-	-	+	-
		L3	-	+	-	-	-
10	0,4	L1	-	-	-	-	-
		L2	++	++	++	++	+
		L3	++	++	-	+	+
11	0,6	L1	-	+	-	-	-
		L2	++	++	++	++	++
		L3	++	++	-	-	-
<u>Atrazin</u>							
12	0,05	L1	++	++	-	-	-
		L2	-	+	-	-	-
		L3	-	+	-	-	++
13	0,1	L1	++	++	++	++	++
		L2	-	-	-	-	-
		L3	++	-	++	++	-
14	0,3	L1	++	++	++	++	++
		L2	-	-	-	-	-
		L3	-	-	-	-	-

eingehende Darstellung und Diskussion ist bei STÖRKEL und LAMPERT (1981) und STÖRKEL (1984) zu finden.

Die Versuche mit 4-Chloranilin zeigen, daß die Algenproduktion bei den getesteten Konzentrationen nicht beeinträchtigt wird. Die Extinktionswerte der kontaminierten Chemostate liegen im Streubereich des Extinktions-Mittelwertes aller unkontaminierten Kulturen von $0,152 \pm 0,020$ (Abb.2). D. magna wird dagegen schon bei 0,05 mg/l in der Produktion stark gehemmt. Die Ergebnisse sind gut reproduzierbar (Abb.4 und 5). Die Substanzverluste im System sind gering. So lag z.B. die Konzentration von 4-Chloranilin bei dem Versuch von Abb.4 am letzten Versuchstag bei 93% der Nominalkonzentration im Gesamt- und Substanzeffekt-Ansatz. Der bei allen Testparametern hochsignifikante Kontrast L2 (Tab.1) weist darauf hin, daß diese Chemikalie vor allem direkt und kaum über die Nahrung die Populationsentwicklung beeinträchtigt. Bei 0,01 mg/l ist der no-effect-level des Systems für 4-Chloranilin erreicht (Abb.3).

Auch bei 4-Nitrophenol wird die Algenstufe des Systems bei den untersuchten Konzentrationen nicht geschädigt. Die Daphnienproduktion ist jedoch bei 10 und 15 mg/l stark verringert (Abb.7 und 8). Die Wirkung scheint dabei sowohl direkt, als auch indirekt über das Futter zu erfolgen, wie die hochsignifikanten Kontraste L1, L2 und L3 zeigen (Tab.1). Die analytische Kontrolle ergab stark schwankende Wiederfindungsraten von 55 bis 95% der Sollkonzentration bei verschiedenen Versuchen. Bei 5 mg/l (Abb.6) dürfte der no-effect-level des Systems erreicht sein.

PCP beeinträchtigt bei den untersuchten Konzentrationen sowohl die Algen- als auch die Daphnien-Stufe des Systems (Abb.2, 9, 10 und 11). Jedoch erweisen sich auch hier die Daphnien als sensibler. Sie werden vor allem direkt geschädigt, wie der hochsignifikante Kontrast L2 in Tab.1 belegt. Der Substanzverlust von PCP aus der freien Lösung liegt zwischen 11 und 40% bei verschiedenen Versuchen. Die Wirkschwelle von PCP im System dürfte bei 0,2 mg/l liegen.

Atrazin übt eine starke Hemmwirkung auf die Algenproduktion aus (Abb.2). Indirekt wird über die Reduktion der Primärproduktion aber auch die Daphnien-Stufe des Systems beeinflusst, obwohl eine direkte Toxizität bei Konzentrationen unter 1 mg/l nicht feststellbar ist (Abb. 13 und 14). Der Kontrast L1 ist für alle Para-

meter hochsignifikant (Tab.1) Bei 0,01 mg/l ist offensichtlich der no-effect-level erreicht (Abb. 12). Die analytische Kontrolle erbrachte Wiederfindungsraten von ca. 80%.

Auf weitere Versuchsergebnisse mit Phenol und 2,4-D , sowie Untersuchungen mit dem Daphnien-Stamm IRCHA und Testläufe mit variabler Algendosis kann hier leider nicht eingegangen werden. Eine Publikation hierzu ist in Vorbereitung.

4. Bewertung des Testsystems

Die große Variabilität zwischen den Kontrollen verschiedener Experimente ist ein Problem, auf das auch andere Autoren hinweisen (CANTON und ADEMA 1978). Es hat zur Folge, daß sowohl bei der Algenstufe, aber vorallem bei den Testparametern der Daphnien-Reproduktion eine Abweichung von ca. 20% von den Kontrollen nicht ohne weiteres auf Chemikalieneinflüsse zurückgeführt werden kann. Auf Grund dieser Einschränkungen lassen sich nur drastische Effekte sichern. Die konzeptionellen Vorteile eines life-cycle-test gegenüber Kurzzeittests, daß sich nämlich kleinste Veränderungen an Lebensdaten, Entwicklungsdauer, Gelegegröße, u.s.w. , die möglicherweise durch Chemikalien verursacht werden, im Verlauf von mehreren Generationen zu deutlichen Ergebnissen aufsummieren, werden dadurch vermindert.

Die Parallelen innerhalb eines Versuches haben demgegenüber bei allen Ansätzen und mit Ausnahme der Eizahl auch bei allen Parametern eine vergleichsweise geringe Streubreite. Das spricht für die methodische Reife des Systems. Die große Variabilität zwischen den Kontrollen bei verschiedenen Experimenten ist daher weniger von systemimmanenten Störgrößen, sondern eher von exogenen Faktoren (z.B. Vorkultur) abhängig.

Neben dem Einfluß von Störgrößen sollten aber auch selbstregulatorische Prozesse innerhalb des Systems beachtet werden, die möglicherweise Chemikalieneffekte kompensieren könnten: So ist z.B. das Wachstum der Algen in den Chemostat-Kulturen durch die abiotischen Bedingungen limitiert, vorallem durch das Angebot an Nährsalzen, wie Vorversuche mit variabler Belüftungsrate und Durchfluß ergeben haben. Wird nun ein Schadstoff zugesetzt, der das Algenwachstum bremst, dann stehen mehr Nährstoffe zur Verfügung, die ihrerseits das Wachstum wieder stimulieren und so zu einer gewissen Kompensation der Hemmung führen können.

Analog kann auch bei der Daphnien-Stufe eine schadstoffbedingte, reduzierte Populationsentwicklung wieder kompensiert werden, da dann mehr Futter für das einzelne Individuum vorhanden ist.

Eine prinzipielle methodische Begrenztheit des Systems ist in der unvollständigen Trennung der Algeneffekte von den direkten Substanzeffekten zu sehen. Der Algeneffekt-Ansatz ist immer mit auf 12% verdünntem Testwasser kontaminiert. Aber auch wenn die Algen erst von dem belasteten Medium abzentrifugiert und resuspendiert als Futter angeboten würden, wären die Schwierigkeiten nicht behoben. Denn gerade bei einzelligen Organismen mit großem Oberflächen-Volumen-Verhältnis können Akkumulations- und Depurationsprozesse sehr schnell verlaufen. Daher besteht das gleiche Problem auch bei dem Substanzeffekt-Ansatz: Die vor der Mischung mit dem Verdünnungswasser unbelasteten Algen kontaminieren sich während des Versuches mit der Testchemikalie, bevor sie von den Daphnien gefressen werden. Die Kinetik solcher Prozesse kann sich im Bereich von wenigen Minuten abspielen, wie ELLGEHAUSEN (1980) am Beispiel von Atrazin gezeigt hat.

Ein durchaus gewünschtes, aber dennoch begrenzendes Element des Testsystems ist die fehlende Rückwirkung des Sekundär- auf den Primärproduzenten. Das "grazing" ist auf die variabel wählbare Futterdosis beschränkt. Allerdings bietet die Trennung der Algenstufe von den Daphnien den Vorteil, daß keine "Klarwasserstadien" erreicht werden können und eine Auslöschung der einen, oder beider Arten durch Räuber-Beute-Interaktionen vermieden wird.

Bei der Auswahl von weiteren Testsubstanzen muß auf die starke Belüftung der Chemostaten geachtet werden. Leicht flüchtige Stoffe werden möglicherweise ausgeblasen, bevor sie ihre Toxizität entfalten können. In jedem Fall müßte eine sorgfältige analytische Kontrolle erfolgen, damit sich die Ergebnisse interpretieren lassen. Bei den hier untersuchten Substanzen waren allerdings die Verlustraten in den Algenkulturen nicht größer als in anderen Teilen des Systems.

Das Testsystem enthält zwar ökosystemare Gesichtspunkte, aber der Vorteil des Systems gegenüber den schon bestehenden Reproduktionstests mit Daphnien (z.B. OECD 1981) ist kritisch mit dem verbundenen apparativen Aufwand zu vergleichen.

Wird das hier untersuchte Testsystem dagegen anderen Konzeptionen gegenübergestellt, die auch versuchen Ökosystemaspekte zu berücksichtigen,

sichtigen, dann relativiert sich die bisher gemachte kritische Bewertung des Systems. Sowohl "naturnahe" Ansätze, wie Untersuchungen an Plastiksackexponaten (FLECKNER 1980), als auch Mikro-ökosysteme (z.B. KERSTING 1981) liefern entweder kaum zu reproduzierende Ergebnisse, oder erfordern einen z.T. erheblichen apparativen Aufwand und benötigen vorallem mehr Zeit.

5. Literatur

- CANTON, J.H. und D.M.M. ADEMA (1978): Reproducibility of short-term and reproduction toxicity experiments with *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 59: 135-140
- ELLGEHAUSEN, H. et al. (1980): Factors determining the bioaccumulation potential of pesticides in the individual compartments of aquatic food chain. *Ecotox. Env. Safety* 4: 134-157
- FLECKNER, W. (1980): Untersuchungen über die Verwendbarkeit von eingeschlossenen Plankton-Lebensgemeinschaften für ökotoxikologische Tests. Staatsexamensarbeit, Frankfurt
- KERSTING, K. (1981): Micro-ecosystems for testing of toxic substances. Research Inst. Nature Management, Annual Report: 75-85
- LAMPERT, W. (1975): A laboratory system for the cultivation of large numbers of *Daphnia* under controlled conditions. *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 48: 138-140
- MÜLLER, H. (1972): Wachstum und Phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemm.) v. Goor in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphatlimitierung. *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 38: 399-484
- OECD (1981): OECD Guidelines for testing of chemicals, Paris
- STÖRKEL, K. (1984): Toxikologische Untersuchungen an einer zweistufigen Labornahrungskette. Berichte der ökologischen Aussenstelle Schlüchtern, im Druck
- STÖRKEL, K. und W. LAMPERT (1981): Subletale Schadstoffwirkung auf ein Modell einer limnischen Nahrungskette. *Verh. der Gesellschaft für Ökologie* (Berlin 1980) Bd. IX: 255-260
- WEBER, E. (1980): Grundriss der biologischen Statistik. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht Nr. 03 7274

Ökotoxikologische Untersuchungen an Karpfen

von

W. Hanke, G. Gluth, T. Giannaros, A. Zachmann und
R. Müller

Zoologisches Institut II der Universität Karlsruhe

Institutsleiter:
Prof. Dr. W. Hanke

September 1984

Zusammenfassung

Bei Karpfen wurde die Wirkung von subletalen Konzentrationen verschiedener Schadstoffe auf biochemisch-physiologische Parameter wie Serum-Glucose, -Cortisol, -Protein, -Cholesterin sowie Leber- und Muskelglykogen untersucht. Die Fische wurden für 6, 24 und 72 Std. in folgenden Schadstoffen gehalten: Aldrin, Atrazin, DDT, Dieldrin, Endrin, Hexachlorbenzol, Lindan, Methanol, 4-N-Phenol und Toluol. Eine Zunahme der Serum-Glucose und des Cortisols waren die stärksten Veränderungen nach der Schadstoffexposition. Der Gehalt der Leber an Glycogen erhöhte sich zunächst und nahm bei längerer Schadstoffeinwirkung ab. Dieser Komplex wird als Stress-Reaktion gedeutet.

Als weiteres Testverfahren wurde das Anschwimmverhalten gegen eine Wasserströmung sowie die allgemeine Schwimmaktivität der Fische nach Schadstoffexposition untersucht. Es wurden subletale Konzentrationen von Phenol, Methanol, Harnstoff, Atrazin und PCP verwendet. Die Schadstoffwirkung konnte an einer verminderten Schwimmfähigkeit aufgezeigt werden.

Die Anwendung der verschiedenen Testverfahren für den Schadstoffnachweis wird diskutiert.

Summary

The influence of sublethal concentrations of different pollutants on biochemical-physiological parameters as serum glucose, cortisol, protein, cholesterol, liver- and muscle-glycogen was investigated in carps. Fish were kept for 6, 24 and 72 hrs. in the following pollutants: aldrin, atrazine, DDT, dieldrin, endrin, hexachlorbenzene, lindane, methanol, 4-N-phenol and toluene. The rise of serum glucose and cortisol were the most abundant changes occurring after exposure to the pollutants. Liver glycogen content firstly increased in most cases and was reduced after longer exposure. The whole complex is interpreted as stress reaction.

As an additional test-system the swimming against a water flow and the usual swimming activity was investigated after exposure to pollutants. Sublethal concentrations of phenol, methanol, urea, atrazine and PCP were used. A reduced swimming ability could be demonstrated as a reaction to the pollutants. The use of the different test methods for the proof on pollutants is discussed.

Einleitung

Fische sind geeignete Testtiere für ökotoxikologische Untersuchungen, da viele Schadstoffe in die Gewässer gelangen und sich dort häufig trotz geringer Wasserlöslichkeit anreichern. Die Verwendung von Fischen ist deshalb aus mehreren Gründen naheliegend. Da viele Schadstoffe von ihnen leicht aufgenommen und angereichert werden, können sie als Testobjekte zur Feststellung der Gewässergüte verwendet werden. Als wichtige Nahrungsquelle für den Menschen sind derartige Untersuchungen an Fischen außerdem bedeutsam für die Lebensmittelkontrolle. Unter den im Wasser lebenden Tieren stehen die Fische als Wirbeltiere dem Menschen näher. Somit können die ökotoxikologischen Veränderungen ihres Stoffwechsels unter Schadstoffeinfluß Hinweise zur Schädlichkeit beim Menschen geben. Die in diesem Zusammenhang angewendeten Methoden sind zahlreich und umfassen prinzipiell das gesamte physiologisch-toxikologische Untersuchungsspektrum. Grundsätzlich läßt sich zwischen der Letalitätsprüfung (LC_{50}) und Versuchen im subletalen Konzentrationsbereich unterscheiden. Unsere zu den letzteren zu zählenden Beobachtungen lassen sich den biochemisch-physiologischen und verhaltensphysiologischen Methoden zuordnen.

Hierbei kann die Schadstoffeinwirkung auf die Fische zu schadstoffspezifischen, bzw. -unspezifischen (Stress-ähnlichen) Veränderungen führen. Spezifische Einflüsse sind in diesem Methodenbereich noch relativ wenig beschrieben worden. Dagegen gibt es zahlreiche Untersuchungen, die zeigten, daß Schadstoffe unabhängig von ihrer chemischen Natur als Stressoren wirken und eine unspezifische Reaktion der Fische hervorrufen.

Bei unseren biochemisch-physiologischen Methoden stellen die Veränderungen der Serum-Glucose und der Cortisol-Konzentration sehr gute Parameter dieser Stress-Reaktion dar. Es wurden außerdem Veränderungen des Leber- und Muskelglykogens, des Serum-Proteins und -Cholesterins unter Schadstoffeinfluß festgestellt. Bei den verhaltensphysiologischen Methoden bietet sich die Messung der Schwimmaktivität der Fische an, um relativ leicht eine Schadstoffwirkung zu erkennen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen soll in diesem Bericht grundsätzlich dargestellt werden:

1. welche Fische sich als geeignete Testtiere anbieten,
2. welche Schadstoffe in subletalen Konzentrationen verwendet werden,

3. welche Dauer der Schadstoffeinwirkung am geeignetsten ist,
4. welche anderen Faktoren unter Umständen berücksichtigt werden müssen (z.B. Temperatur),
5. wie das verwendete Methodenspektrum zu bewerten ist, d.h. welche Testparameter für ökotoxikologische Untersuchungen geeignet sind.

Versuchsdurchführung und Problemstellung

1. Fische und Methoden

Für die biochemisch-physiologischen Untersuchungen wurden ausschließlich Karpfen (Cyprinus carpio L., Länge 12-17 cm, Gewicht 40-80 g) verwendet. Die Fische wurden von Aufzuchtanstalten bezogen und im Institut in einer Durchflußanlage gehalten. Nach einer Anpassungszeit von ca. 3 Wochen wurden die Versuchsfische in Aquarien (je 6 Tiere in 10 l) bei 17° C gesetzt, in denen sie nach 2 Wochen auch den Schadstoffen exponiert werden (Abb. 1). Ausführliche Beschreibung dieses Test-Aquarien-Systems in Gluth und Hanke (1983). Grundsätzlich erfolgte die Schadstoff-Zugabe im stationären (nicht durchströmten), belüfteten System. Hierbei mußte das Wasser alle 24 Std. erneuert werden, da die Schadstoffkonzentrationen in dieser Zeit um ca. 20% abnahmen. Diese Abnahme beruhte sowohl auf einer Akkumulation im Fisch als auch auf bakterieller Oxidation und Abbau im Wasser. Für Phenol konnte z.B. nachgewiesen werden, daß eine Konzentration von 10 mg/l in den Aquarien bei Besatz mit Fischen und guter Durchlüftung in 24 Std. sogar um 40% abnahm.

Zum Ende der Schadstoffexposition wurden die Karpfen in einer Überdosis MS 222 rasch betäubt. Nach Freilegen des Herzens wurde es punktiert und Blut für die weiteren Analysen entnommen. Außerdem wurde ein Stück der weißen epaxialen Muskulatur und der Leber zur Glykogenbestimmung herauspräpariert.

Folgende Methoden wurden dann mit den Proben durchgeführt:

- a) Bestimmung der Serum-Glucosekonzentration mit der Glucose-Oxidase-Reaktion,
- b) Bestimmung der Serum-Cortisolkonzentration mit einem Radio-Immuno-Assay ,
- c) Bestimmung des Leber- und Muskelglykogens nach Extraktion des Glykogens, Hydrolyse und Glucose-Oxidase-Reaktion der Glucose,

Abb. 1:

Anordnung der Aquarien und des Wasserflusses für die Anpassung der Fische an die Test-Bedingungen vor der Applikation der Schadstoffe

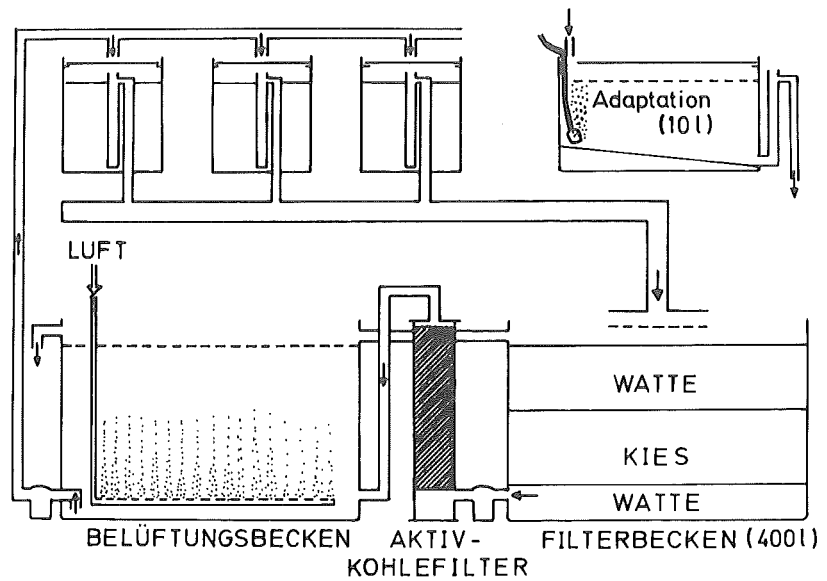


Abb. 2:

Strömungsapparatur, Ausschnitt der Schwimmkammer mit der Anordnung der Sensoren in der zuletzt verwendeten Form

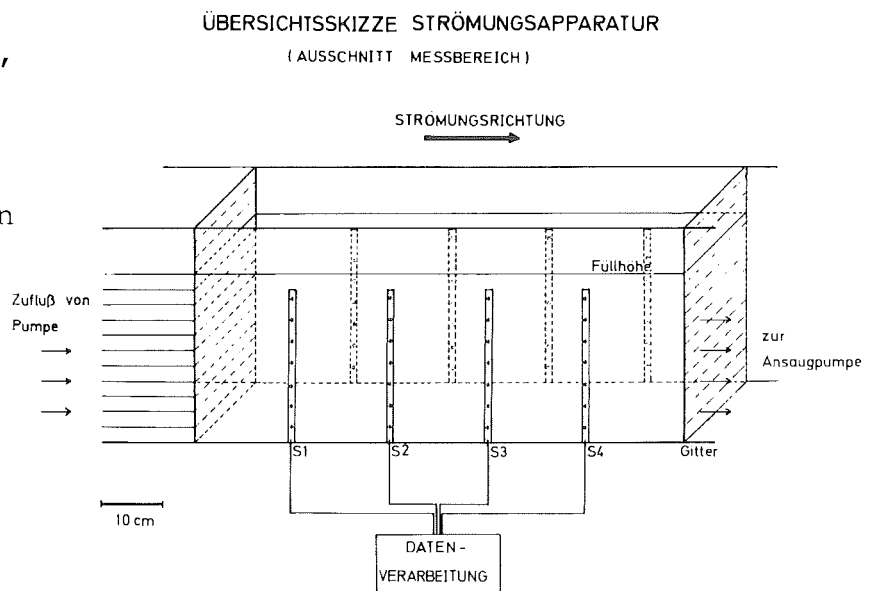
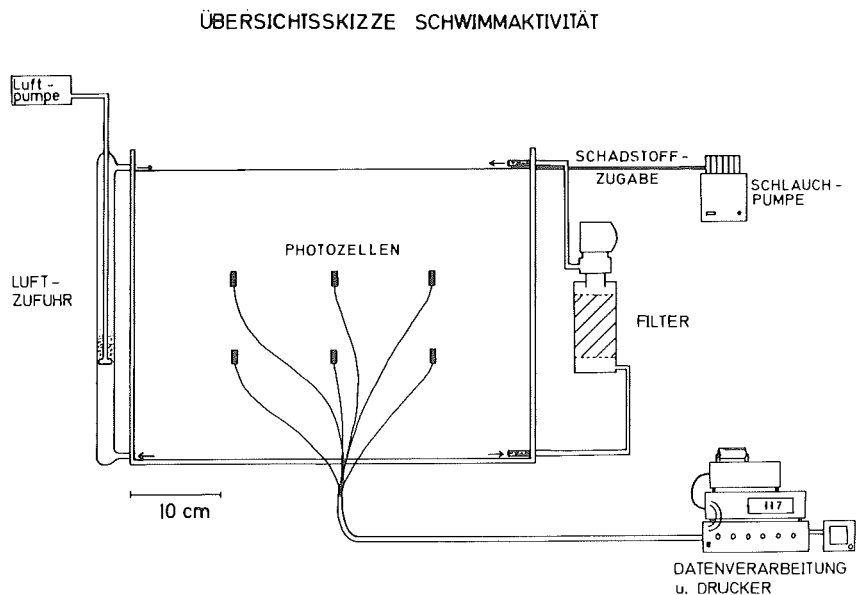


Abb. 3:

Apparatur zur Messung der täglichen Schwimmaktivität



- d) Bestimmung des Serum-Proteins,
- e) Bestimmung des Serum-Cholesterins,

Für die Messung der Schwimmaktivität wurden neben Karpfen auch teilweise Forellen (Salmo gairdneri) verwendet. Bei diesen Versuchen ging es um 3 verschiedene Probleme:

- a) Lassen sich Unterschiede zwischen den beiden Arten erkennen?
Forellen sind gute Schwimmer im freien Wasser, während Karpfen als Grundfische mehr im Schlamm leben.
- b) Was sind die wirksamsten Grenzkonzentrationen der Schadstoffe bei beiden Arten? Forellen reagieren im allgemeinen sehr empfindlich auf Schadstoffe.
- c) Welche Methode der Registrierung ist zum Einsatz am geeignetsten?

Die Schwimmaktivität wurde nach 2 verschiedenen Methoden gemessen:

- a) Anschwimmen der Fische gegen eine definierte Wasserströmung und
- b) allgemeine Schwimmaktivität ohne eine Wasserströmung.

Im ersten Fall handelt es sich um eine am Institut entwickelte Strömungsapparatur in Form eines ovalen Ringkanals aus Glas, in dem mit Hilfe einer Pumpe eine Strömungsgeschwindigkeit des Wassers von ca. 40 cm/sec erzeugt wird (Abb. 2). Die Fische (pro Versuchsgruppe 6 Tiere) halten sich in einem durch Metallgitter begrenzten Teil der Apparatur auf, der seiner Länge nach durch eine serielle Anordnung von 28 Infrarotlicht-Photozellen und gegenüberliegenden Empfängern unterteilt ist. Jeweils 7 Photozellen und Empfänger sind übereinander angebracht und bilden somit eine "Lichtschränke", insgesamt 4 ($S_1 - S_4$). Das Durchqueren der Lichtschränken löst die Zählung eines Ereignisses (Count) aus. Die Counts werden automatisch über einen Computer registriert. Dabei werden in 5 Minuten-Abständen die Summen der Counts für die 4 Lichtschränken getrennt voneinander errechnet und ausgedruckt. Mit Hilfe dieser Lichtschränken ist es möglich, Aussagen über die Schwimffähigkeit der Fische gegen die Strömung, bzw. auch eine Erschöpfung und Abtreiben mit der Strömung zu machen. Für diese Versuche wurden die Fische für 24 Std. in dem bereits beschriebenen Test-Aquarien-System den entsprechenden Schadstoffen ausgesetzt und anschließend unmittelbar in die Strömungsapparatur gesetzt. Der Schwimmversuch wurde dann ohne Schadstoff durchge-

führt. Bei längerer Schadstoffexposition wurden die Fische nach dem 2-stündigen Aufenthalt in der Schwimmapparatur wieder in die Testaquarien zurückgesetzt. Der Versuchsablauf ist genauer bei Giannaros et al. (1984) beschrieben.

Bei dem zweiten Aktivitätssystem handelt es sich um ein Vollglas-aquarium, an dem in regelmäßigen Abständen ebenfalls Lichtschranken angebracht sind (Abb. 3). Die Registrierung der Counts und ihre Auswertung erfolgte wie bei der Strömungsapparatur beschrieben. Die Fische (je 6 pro Versuchsgruppe) wurden in dieser Anlage zunächst für 3 Tage ohne Schadstoff gehalten, um die normale Aktivität zu ermitteln. Dann erfolgte eine einmalige Schadstoffzugabe und weitere Messung der Aktivität für 2 bis 3 Tage. Eine ausführliche Darstellung dieser Methoden zur Schwimmaktivität findet sich in Giannaros et al. (1984).

2. Schadstoffe und Konzentrationen

Die Schadstoffe und ihre Konzentrationen wurden nach den Angaben der Literatur ausgewählt, z.B. nach "Merkblätter über Referenz-chemikalien", Batelle Institut Frankfurt, 1982, und eigenen früheren Untersuchungen (siehe Publikationsliste). Es wurden hierbei subletale Konzentrationen verwendet, in denen die Fische länger als 2 Wochen überleben können. Für die biochemisch-physiologischen Untersuchungen wurden folgende Schadstoffe verwendet:

1.	100 µg/l	Aldrin	270 nM
2.	100 µg/l	Atrazin	465 nM
3.	50 µg/l	DDT	140 nM
4.	20 µg/l	Diieldrin	52 nM
5.	2 µg/l	Endrin	5.2 nM
6.	100 µg/l	Hexachlorbenzol (HCB)	350 nM
7.	100 µg/l	Lindan	350 nM
8.	1 ml/l	Methanol	50 nM
9.	100 µg/l	4-N-Phenol	720 nM
10.	100 µg/l	Toluol	1.1 µM

Die schwerlöslichen Substanzen wurden in Äthanol gelöst und in die Test-Aquarien gegeben. Die Karpfen wurden dann diesen Schadstoffkonzentrationen für 6, 24 und 72 Std. ausgesetzt.

Für die Untersuchungen der Schwimmaktivität wurde in einem

Versuchsansatz, in dem die Karpfen mit Forellen verglichen werden sollten, nur Phenol als Schadstoff verwendet. Konzentrationen: 50, 100, 1000 und 10 000 µg/l. Die Fische wurden in diesen Lösungen für 24, 48 und 72 Std. gehalten.

In einem anderen Versuchsansatz, in dem nur Karpfen auf verschiedene Schadstoffe getestet wurden, erfolgte eine 24-stündige Exposition an folgende Substanzen:

1. 1, 5, 10 ml/l Methanol
2. 1, 5, 10 mg/l Harnstoff
3. 0.1, 0.5, 1.0 mg/l Atrazin
4. 0.01, 0.05, 0.1 mg/l PCP

Atrazin und PCP wurden in Äthanol gelöst.

Anschließend wurden die Fische für 2 Std. in die Strömungsapparatur gesetzt. In dem Schwimmaktivitätsaquarium wurden sie für 2 bis 3 Tage in den Schadstoffen gehalten.

Ergebnisse und Diskussion

1. Biochemisch-physiologische Untersuchungen

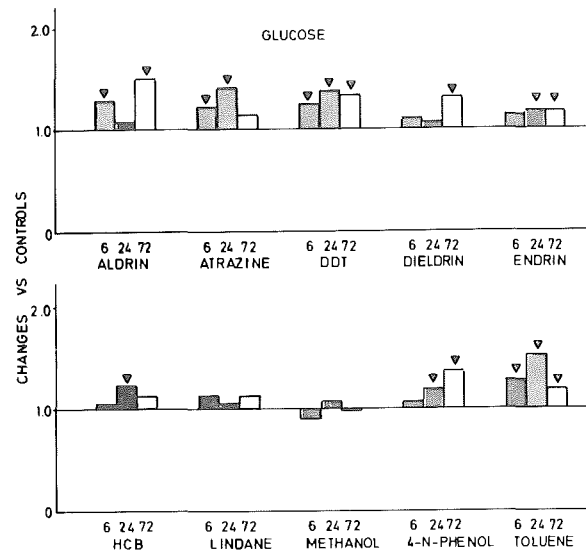
Bei diesen Untersuchungen wurden die Veränderungen der Glucose und des Cortisols im Serum, des Leber- und Muskelglykogens, sowie des Serum-Proteins und-Cholesterins nach Einwirkung der oben aufgeführten Schadstoffe bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß alle subletalen Konzentrationen dieser Substanzen mehr oder weniger deutliche Veränderungen bewirken. Um diesen Einfluß erkennen zu können, reicht eine Expositionszeit bis zu 72 Std. aus (Gluth und Hanke, 1984a). Die Reaktion der Karpfen auf die 10 verschiedenen Schadstoffe äußerte sich in

- a) einer Erhöhung der Serum-Glucose und des Serum-Cortisols, z.T. schon nach kurzfristiger Schadstoff-Einwirkung (Abb. 4, 5),
- b) einer Abnahme des Leber- und Muskelglykogens, besonders nach längerer Einwirkung (Abb. 6, 7) und
- c) einer Abnahme des Serum-Proteins und Cholesterins (Abb. 8, 9).

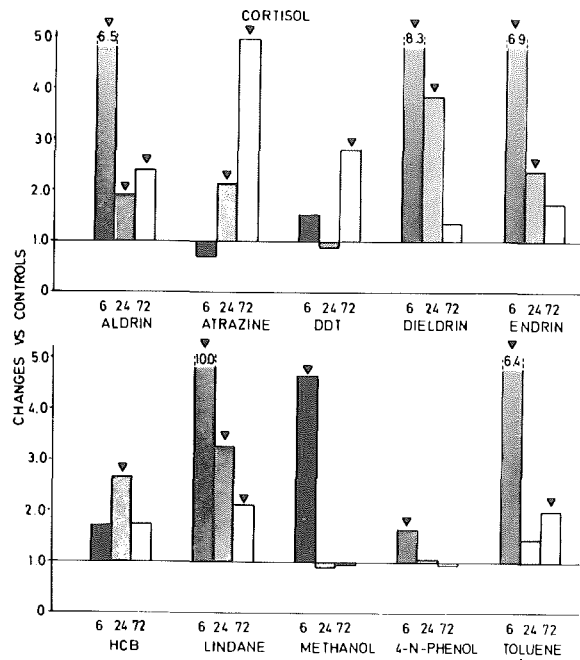
Die deutlichsten Veränderungen konnten für das Cortisol und die Glucose festgestellt werden. Alle 10 Schadstoffe erhöhten die Cortisol-Konzentration, wobei 7 der verwendeten Substanzen bereits nach 6 Std. die stärkste Wirkung zeigten. Ähnliche Veränderungen

Abb. 4 - 9: Veränderungen im Vergleich zu Kontrollen (Angabe in %) nach 6, 24 oder 72 Std. Behandlung (Temperatur 17°C). ▼ signifikante Änderung auf dem 5%-Niveau

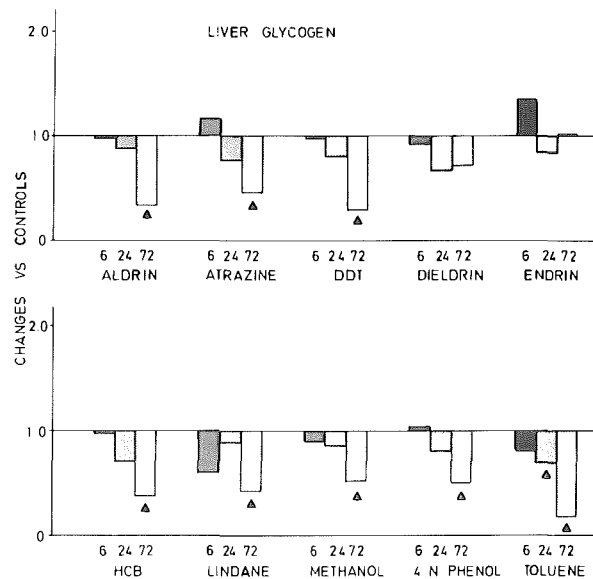
Serum-Glucose



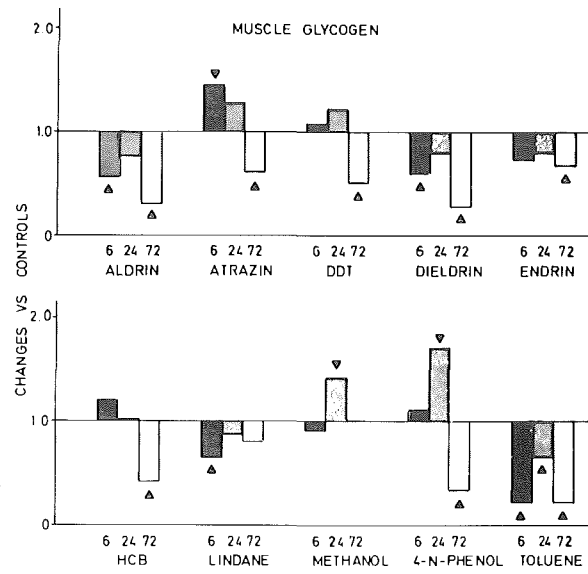
Serum-Cortisol



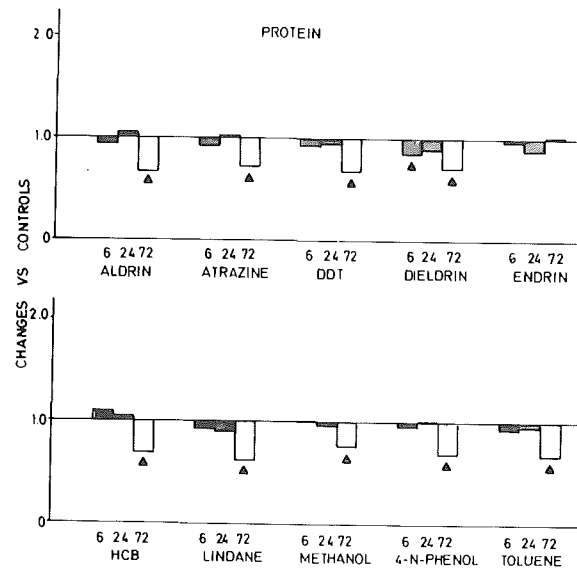
Leber-Glykogen



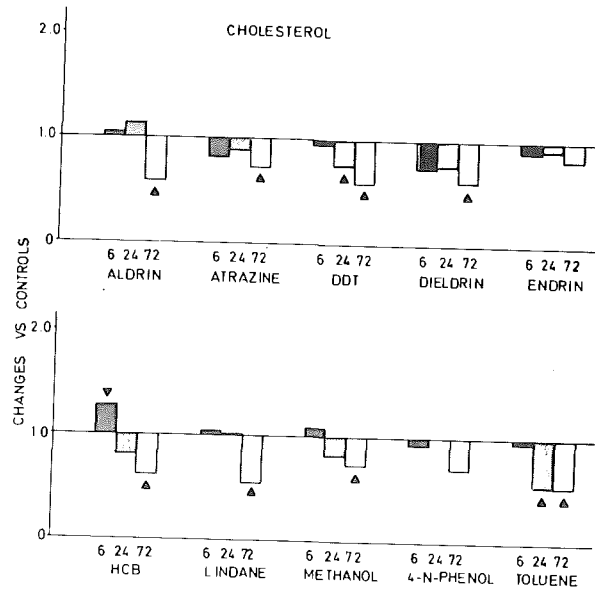
Muskel-Glykogen



Serum-Protein



Serum-Cholesterol



ließen sich auch für die Serum-Glucose zeigen: 6 Schadstoffe bewirkten eine signifikante Erhöhung der Glucose nach 24 bis 72 Std. DDT und Toluol waren bereits nach 6 Std. wirksam. Dagegen zeigten Lindan und Methanol keinen Einfluß auf die Glucose.

Vergleicht man die Wirkung der verschiedenen Schadstoffe auf die Glucose und das Cortisol, so ergibt sich ein generelles Problem: Es läßt sich keine spezifische Korrelation zwischen einem bestimmten Schadstoff und seiner Wirkung auf beide Parameter feststellen. Alle Schadstoffe bewirken eine mehr oder weniger unspezifische Veränderung der Glucose und des Cortisols. Sie stellen damit Stressoren dar, die im Fisch die typischen Stress-Reaktionen hervorrufen: Erhöhung der Cortisol-Konzentration und der Blut-Glucose. Der Fisch reagiert auf den äußeren Stressor mit einer schnellen Abgabe von Cortisol aus dem Interrenalorgan (Nebenniere bei höheren Wirbeltieren). Cortisol steigert die Glucose-Abgabe aus der Leber entweder über den Weg des Glykogenabbaus (Glykogenolyse) oder den Weg der Bildung von Glucose aus Aminosäuren (Gluconeogenese). Beides führt zu einem Anstieg der Serum-Glucose. Deshalb tritt die Glucose-Erhöhung auch zeitlich später auf als die Cortisol-Reaktion. Dieser Mechanismus läßt sich ebenfalls bei der Bestimmung des Leber- und Muskelglykogens feststellen. Bei 8 Schadstoffen sinkt der Glykogengehalt der Leber bzw. des Muskels (Glykogenolyse). Vereinzelt tritt hierbei auch eine kurzfristige Zunahme des Glykogens auf (Gluconeogenese).

Die Veränderungen des Serum-Proteins und -Cholesterins stellen ähnliche unspezifische Reaktionen dar. Ihre Abnahme setzt meist nach 72 Std. ein. Der Wirkungsmechanismus ist allerdings schwieriger zu interpretieren. Ihre Veränderungen deuten auf eine Wasserakkumulation im Plasma hin (Gluth und Hanke 1984a).

Die Untersuchungen zeigen, daß sich die erwähnten 6 biochemischen Parameter als Testkriterien für einen Schadstoffnachweis durchaus eignen, wenn nicht der spezifische Wirkungsmechanismus untersucht werden soll. Hierbei sind das Cortisol und eventuell auch die Glucose die empfindlichsten Parameter.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen von äußeren Faktoren wie z.B der Temperatur abhängen. Bei Karpfen, die bei Temperaturen von

12, 17 und 20° C gehalten wurden, war der Schadstoffeinfluß auf das Leberglykogen z.B. am stärksten bei 17° C. Ausführliche Darstellung bei Gluth und Hanke(1983, 1984b).

2. Untersuchungen zur Schwimmaktivität

Für die Untersuchungen zur Schwimmaktivität in der Strömungsapparatur sind die Karpfen gut geeignet. Bei einer für diese Fische optimalen Strömungsgeschwindigkeit von 40 cm/sec können sie fast 2 Std. gegen diese Strömung schwimmen. Im Vergleich hierzu sind die Forellen natürlich die besseren Schwimmer. Noch nach 48 Std. ist kein Abtreiben erkennbar.

Andererseits ist die Empfindlichkeit der Forellen gegenüber Schadstoffen deutlich höher als die der Karpfen. Der Vergleich zwischen Forellen und Karpfen ist nur für Phenol möglich, da keine weiteren Substanzen an den Forellen ausgetestet wurden. Die letale Konzentration liegt für die Forellen bei 1000 µg/l Phenol, für die Karpfen bei 10 000 µg/l.

Während 50 µg/l Phenol keine wesentliche Beeinträchtigung der Forellen bewirkt, kommt es nach einer Vorbehandlung mit 100 µg/l zu einem verstärkten Abtreiben nach ca. 1 Std. (Abb. 10). Die Karpfen sind bei gleicher Behandlung mit 100 µg/l Phenol wesentlich schwimmfähiger und zeigen erst manchmal bei Behandlung mit 100 µg/l, deutlich jedoch bei einer solchen von 1000µg/l Phenol verstärktes Abtreiben (Abb. 11).

Ausführlichere Ergebnisse liegen über die anderen Schadstoffe (Methanol, Harnstoff, Atrazin und PCP) vor. Die hier getesteten Substanzen rufen bei den Karpfen im Anschwimmverhalten unterschiedliche Reaktionen hervor: Bei vorheriger Exposition an Atrazin vermindern Konzentrationen von 0.5 und 1 mg/l deutlich die Resistenz gegen die Strömung (Abb. 12), bei PCP bereits bei 0.05 und 0.1 mg/l (Abb. 13). Harnstoff und Methanol reduzieren die Schwimmfähigkeit ab 1 g bzw. 1 ml/l.

Es ist noch fraglich, ob diese Ergebnisse Rückschlüsse auf die Toxizität von Schadstoffen und ihre "unteren Grenzkonzentrationen" erlauben. Sie verdeutlichen jedoch, daß der Parameter "Anschwimmen gegen eine Wasserströmung" sehr gut geeignet ist, um generell eine Kontamination der Fische mit Schadstoffen in relevanten Konzentra-

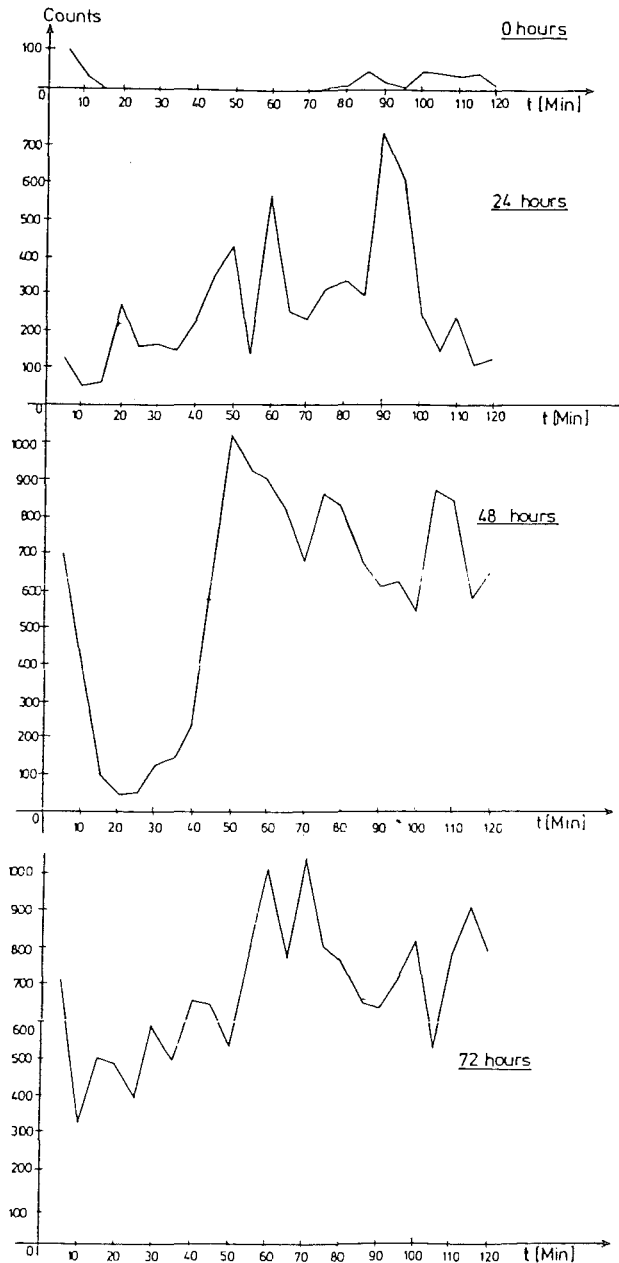


Abb. 10:

Anschwimmversuche von Forellen

Veränderung der Anzahl von Ereigniszählungen am Kammerende im Laufe von 2 Std. nach unterschiedlicher Expositionszeit an 100 µg/l Phenol (0, 24, 48, 72 Std.)

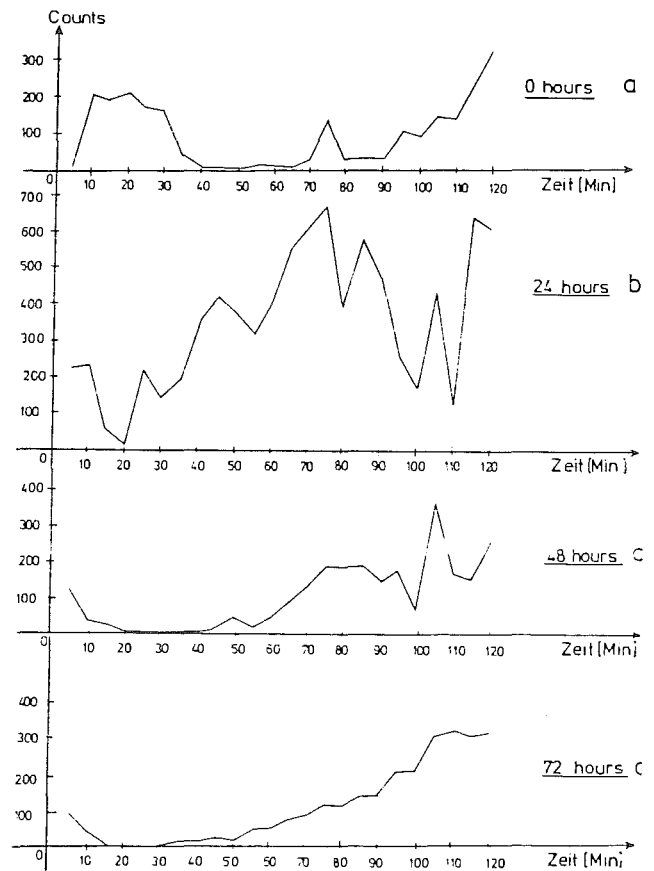


Abb. 11:

Anschwimmversuche von Karpfen

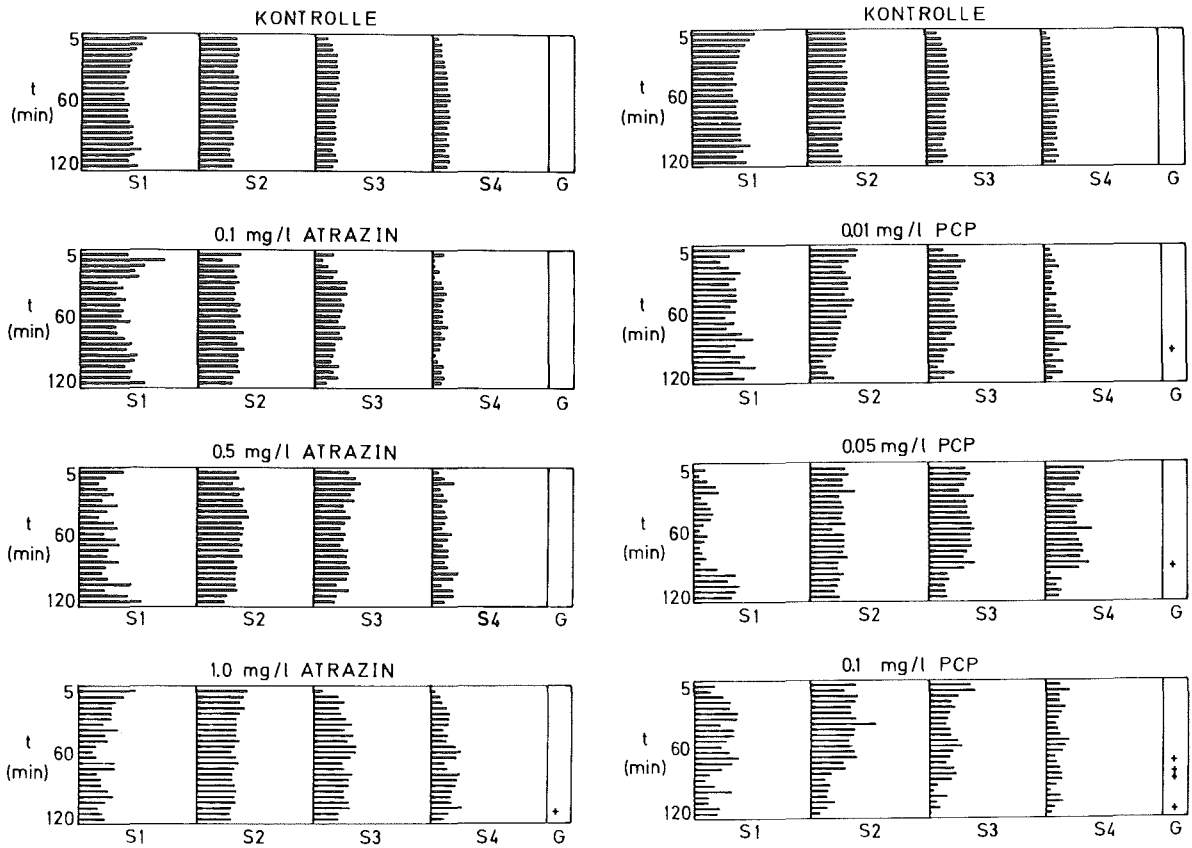


Abb. 12/13:

Veränderung des Anschwimmverhaltens nach 24-stdg. Behandlung mit verschiedenen Atrazin- oder PCP-Konzentrationen. Ereigniszählungen an 4 Schranken laut Abb. 2

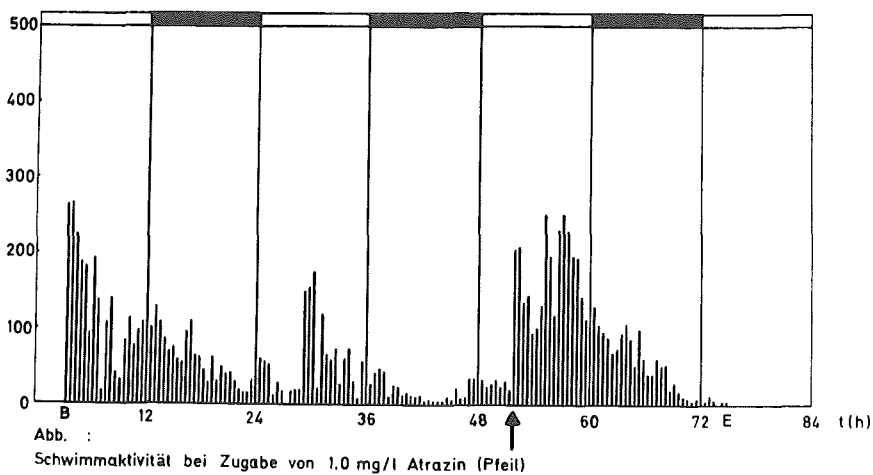


Abb. 14:

Veränderung der Schwimmaktivität bei Zugabe von 1.0 mg/l Atrazin (Pfeil) bei tagesaktiven Tieren

tionen festzustellen. Hierbei ist kein Eingriff in die Tiere erforderlich.

Die Messung der Schwimmaktivität ohne Wasserströmung hat interessante Ergebnisse geliefert, die allerdings die Beurteilung eines Schadstoffeinflusses zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch erschweren. Die Versuche zeigten zunächst, daß es sowohl tag-aktive als auch nacht-aktive Karpfen gibt. Da der Schadstoff immer am Tage gegeben wurde, findet man unterschiedliche Wirkungen bei den beiden Aktivitätstypen. Z. B. hat 0.1 mg/l Atrazin keinen Effekt auf die Schwimmaktivität bei nacht-aktiven Tieren. Dagegen bewirkt 1.0 mg/l Atrazin eine deutliche Aktivitätssteigerung bei tag-aktiven Fischen (Abb. 14).

Die Versuche sind noch nicht beweiskräftig, da verschiedene Konzentrationen von Schadstoffen vorlagen. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, daß subletale Schadstoffkonzentrationen, am Tag gegeben, bei tagaktiven Tieren wirken, während sie, bei Tag gegeben, bei nacht-aktiven Fischen oft wirkungslos bleiben.

Zusammenfassung und Bewertung des Methodenspektrums

Die in diesem Bericht aufgeführten Untersuchungsmethoden eignen sich als Testkriterien für den Einfluß von Schadstoffen. Unter den biochemisch-physiologischen Methoden stellt sicherlich das Cortisol den empfindlichsten Parameter dar. Sein Nachweis mit dem Radioimmunoassay ist jedoch nicht einfach. Andere geeignete Parameter wie z.B. die Glucose lassen sich in dieser Hinsicht einfacher bestimmen. In der Anwendung auf einen Schadstoff sollten immer mehrere biochemische Parameter untersucht werden, um die Wirkung möglichst deutlich zu machen. Hierfür reichen im allgemeinen Expositionszeiten bis zu 72 Std. aus.

Neben den im Bericht erwähnten 6 biochemischen Methoden bieten sich noch weitere Parameter an, wie z.B. die Bestimmung der Kiemen ATP-ase und der Acetylcholinesterase im Blut und Gehirn, über die in dieser Arbeitsgruppe bereits Ergebnisse vorliegen (Hanke et al. 1982, 1983).

Bei den verhaltensphysiologischen Untersuchungen ist die Messung des Anschwimmverhaltens der Fische in der Strömungsapparatur eine geeignete Methode, um einen Schadstoffeinfluß ohne Eingriff in

die Tiere festzustellen. Diese Anlage könnte bei der Gewässerüberwachung eingesetzt werden, um eine plötzlich auftretende starke Verschmutzung mit Schadstoffen frühzeitig erkennen zu können.

Die Tab. 1 soll noch einmal einen kurzen Überblick über das verwendete Methodenspektrum und seine Bewertung geben.

Tab. 1: Bewertung des Methodenspektrums als Einsatz für Schadstoffnachweise

Organsystem	Parameter	Eignung	Einwände
Blut:	Cortisol	++	technisch schwierig
	Glucose	++	keine
	Protein	+	Wirkungsmechanismus unklar
	Cholesterin	+	Wirkungsmechanismus unklar
Leber:	Glykogen	++	Reaktion deutlich biphasisch
Muskel:	Glykogen	+	Abhängigkeiten unklar
Schwimmaktivität:	Strömungsapparatur	++	keine
	allgem. Schwimmaktivität	?	Abhängigkeiten unklar

++ : als Testparameter sehr gut geeignet

+ : gut geeignet

Weitere Untersuchungen zur Ökotoxikologie von Schadstoffen bei Fischen werden nach zwei Richtungen ausgeweitet:

1. Wirken bei Schadstoffkombinationen die einzelnen Schadstoffe additiv oder synergistisch? Sehr wichtig ist festzustellen, ob es vielleicht Schutzfunktionen (antagonistische Wirkungen) einzelner Schadstoffe gibt.
2. Welche Wirkungsmechanismen (direkte Primärmechanismen) liegen den Schadstoffeffekten zugrunde. Dies wird an in vitro-Präparationen von Leber, Niere, Gonaden, Kiemen, Gehirn getestet.

PUBLIKATIONEN ZUM BMFT-PROJEKT (Hanke)

1. Ausführliche Publikationen

HANKE W. (ed.) (1980), Untersuchungen über den Einfluß von Schadstoffen auf Fische. Karlsruher Beiträge zur Zoophysiology, Bd. 5.

★ HANKE W., BITTNER A., HORN G., MÜLLER R. und KEPPLER R. (1982), Untersuchungen der physiologischen Wirkungen von Schadstoffen bei Karpfen. Jül-Spez 163, 42 - 63.

★ HANKE W., GLUTH G., BUBEL H. and MÜLLER R. (1983), Physiological changes in carps induced by pollution. Ecotoxicol. Environm. Safety 7, 229 - 241.

★ GLUTH G. and HANKE W. (1983), The effect of temperature on physiological changes in carp, Cyprinus carpio L., induced by phenol. Ecotoxicol. Environm. Safety 7, 373 - 389.

★ GLUTH G. and HANKE W. (1984a), A comparison of physiological changes in carp, Cyprinus carpio, induced by several pollutants at sublethal concentrations. I. The dependency on exposure time. Ecotox. Environm. Safety (in press)

★ GLUTH, G. and HANKE W. (1984b), A comparison of physiological changes in carp, Cyprinus carpio, induced by several pollutants at sublethal concentration - II. The dependency on the temperature. Comp. Biochem. Physiol. (in press)

GLUTH, G., D. FREITAG, F. KORTE AND W. HANKE (1985), Accumulation of pollutants in fish. (in preparation)

★ GIANNAROS T., ZACHMANN A., GLUTH G. und HANKE W. (1984), Der Einfluß von Phenol und anderen Schadstoffen auf die Schwimmaktivität von Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) und Karpfen (Cyprinus carpio). Karlsruher Beiträge zur Zoophysiology, Bd. 10.

*) Die markierten Arbeiten wurden im Text zitiert.

2. Kurze Mitteilungen und Abstracts

BITTNER A., MÜLLER R., KEPPLER R. und HANKE W. (1980), Veränderungen des Elektrolytgehaltes bei Karpfen (Cyprinus carpio) unter dem Einfluß von Umweltgiften. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1980, 276.

MÜLLER R., BITTNER A., KEPPLER R. und HANKE W. (1980), Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels bei Karpfen (Cyprinus carpio) unter dem Einfluß von Umweltgiften. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1980, 277.

ASSEM M., ABO HEGAB S. and HANKE W. (1982), Response of cortisol to pollutants in fish. Gen. comp. Endocrinol. 46, 408.

3. Experimentelle Examensarbeiten (Zoologisches Institut Karlsruhe)

HORN G. (1980), Der Einfluß von Atrazin auf das Blutbild des Karpfens (Cyprinus carpio L.) . Thesis, Universität Karlsruhe.

BUBEL H. (1981), Schadstoffe und ihre physiologischen Wirkungen auf salzwasseradaptierte (1,2%) Karpfen (Cyprinus carpio L.) . Thesis, Universität Karlsruhe.

GIANNAROS T. (1984), Der Einfluß von Phenol auf die Schwimmaktivität von Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) und Karpfen (Cyprinus carpio L.) . Thesis, Universität Karlsruhe.

ZACHMANN A. (1984), Schwimmaktivität und Anschwimmverhalten von Fischen unter Einfluß von Umweltschadstoffen. Thesis, Universität Karlsruhe.

